

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KACANG
TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP
PENURUNAN KADAR MALONDIALDEHYDE DAN
EKSPRESI AMYLOID β PADA OTAK TIKUS PUTIH
(*Rattus norvegicus*) MODEL OVARIEKTOMI**

TESIS

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Magister**



**OLEH:
TANTI TRI LESTARY
196070400111030**

**PROGRAM STUDI MAGISTER KEBIDANAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2021**


TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP PENURUNAN KADAR MALONDIALDEHYDE DAN EKSPRESI AMYLOID β PADA OTAK TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL OVARIKTOMI

OLEH:
TANTI TRI LESTARY
196070400111030

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 20 Agustus 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PEMBIMBING


Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG (K)
NIP. 19570630198412001
Ketua


Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M. Kes
NIP. 196603231997032001
Anggota

Malang, 31 Agustus 2021
Universitas Brawijaya
Fakultas Kedokteran
Dekan,


Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., SpA(K)
NIP. 197307262005011008

TESIS

PENGARUH EKSTRAK ETANOL KACANG TUNGGAK (*Vigna unguiculata*) TERHADAP PENURUNAN KADAR MALONDIALDEHYDE DAN EKSPRESI AMYLOID β PADA OTAK TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus*) MODEL OVARIEKTOMI

OLEH:
TANTI TRI LESTARY
196070400111030

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal: 20 Agustus 2021
dan dinyatakan memenuhi syarat

KOMISI PENGUJI

Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, Sp. OG (K)
NIP. 195706301984121001
Ketua

Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M. Kes
NIP. 196603231997032001
Anggota penguji

Prof. Dr. dr. Nurdiana, M. Kes
NIP. 195510151986032001
Anggota penguji

Dr. Husnul Khotimah, S. Si., M. Kes
NIP. 197511252005012001
Anggota penguji

PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam Naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis di kutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia tesis ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 Ayat 2 dan pasal 70)

Malang, 20 Agustus 2021

Mahasiswa,



Nama : Tanti Tri Lestary
NIM : 196070400111030
PS : Magister Kebidanan
FAK : Fakultas Kedokteran



Karya ini saya persembahkan untuk
Keluarga tercinta dan terkasih yang telah mendukung dan
Selalu mendoakan yang terbaik selama
perjalanan *study* dan pengerjaan karya ini
Tidak lupa kepada para pimpinan Universitas Borneo
Tarakan Yang telah memberikan kesempatan kepada saya
untuk Menempuh pendidikan Magister Kebidanan di
Universitas Brawijaya Malang

RINGKASAN

Tanti Tri Lestary

Pengaruh Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* dan Ekspresi *Amyloid β* pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi, Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Ketua Komisi Pembimbing Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K) ; Anggota Dr. dr. Dwi Yuni Hidayati, M.Kes

Menopause dapat menyebabkan terjadinya penurunan kualitas hidup dan menimbulkan masalah kesehatan. Keadaan menopause memiliki efek samping jangka panjang salah satunya adalah Demensia yang didominasi penyakit Alzheimer. Pada tahun 2016 terdapat 700.000 jumlah kematian yang diakibatkan oleh penyakit Alzheimer. Berkurangnya hormone estrogen pada masa menopause dipercaya menjadi pemicu terjadinya *Stres Oksidatif* pada otak yang menyebabkan kerusakan sel neuron hingga terjadinya Alzheimer. *Stress Oksidatif* terjadi ketika produksi *Reactive Oxygen Specie* (ROS) yang dihasilkan mitokondria otak tidak diimbangi dengan produksi antioksidan sebagai penangkalnya. *Stress Oksidatif* yang terjadi pada otak dapat di tandai dengan meningkatnya Peroksidasi Lipid yang menghasilkan *Malondialdehyde*. ROS merupakan senyawa yang sangat reaktif yang dapat merusak protein, DNA, dan lipid seperti Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). Peroksidasi lipid terjadi saat radikal bebas seperti OH[•] menyerang Hidrogen dari *Fatty Acid* (LH) dan menghasilkan *Radical Lipid* (L[•]). Selanjutnya L[•] yang bereaksi dengan molekul O₂ dan membentuk *Radical Peroxyl Lipid* (LOO[•]). LOO[•] melalui reaksi siklisasi untuk membentuk endoperoksida, yang akhirnya membentuk MDA.

Alzheimer merupakan penyakit yang disebabkan adanya penumpukan peptida *Amyloid β* yang membentuk plak di dalam otak yang mengganggu fungsi *synaps* dan mengakibatkan kematian neuron. *Amyloid β* dipercaya dapat memicu terjadinya kerusakan membran sel sehingga mengganggu keseimbangan Ca²⁺ pada mitokondria. Hal ini dapat menginduksi produksi ROS yang berlebihan dan menyebabkan terjadinya kerusakan sel neuron yang menyebabkan terjadinya Alzheimer. Berkurangnya hormon estrogen pada wanita menopause mengakibatkan berkurangnya antioksidan endogen yang dapat mencegah terjadinya kerusakan sel neuron yang diinduksi oleh peningkatan ROS. Hormon estrogen memiliki kemampuan dalam menginduksi produksi antioksidan endogen yang diperlukan untuk mencegah terjadinya *Stress Oksidatif*. Obat-obatan yang diberikan pada penderita Alzheimer memiliki efek samping yang tidak diharapkan seperti insomnia, gastritis dan lainnya. Kacang Tunggak merupakan tanaman yang mengandung senyawa fitoestrogen yang didominasi jenis genistein. Genistein memiliki kemiripan struktural dengan estrogen endogen. Genistein membantu meningkatkan ekspresi enzim antioksidan secara alami, sehingga ROS dapat dinonaktifkan. Sehingga diharapkan dapat mencegah terjadinya *Stress Oksidatif* yang dapat menyebabkan Alzheimer pada wanita meopause.

Tujuan penelitian ini untuk membuktikan ekstrak ethanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) dan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) tua model ovariektomi. Metode yang digunakan adalah *eksperimental post test control design*. Sampel yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) betina yang dikondisikan hipoestrogen dengan tindakan ovariektomi sehingga menyerupai keadaan menopause. Jumlah replikasi pada penelitian ini adalah 6 replikasi dengan 1 kelompok kontrol positif, 1 kelompok kontrol negatif, 1 kelompok estradiol, 1 kelompok dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1,25mg/kgbb/hari, 1 kelompok dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 2.5 mg/kgbb/hari, dan 1 kelompok dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 5mg/kgbb/hari. Kadar MDA di ukur dengan ELISA dan ekspresi *Amyloid β* di ukur dengan pengamatan

Immunofluorescence. Analisis data secara statistik menggunakan *One Way Anova* yang dilanjutkan dengan *Multiple Comparisson* berupa *Least Significant Different* (LSD).

Hasil uji *Shapiro-Wilk* untuk normalitas data diperoleh bahwa kadar MDA dan ekspresi *Amyloid β* untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan *p-value* yang kesemuanya memiliki nilai lebih esar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.005$, Jadi semua data telah memenuhi uji prasyarat parametrik. Berdasarkan hasil uji perbandingan berganda sengan uji LSD menunjukkan bahwa ada terjadi peningkatan rerata kadar MDA kelompok kontrol negatif (tanpa ovariektomi) (3.18 ± 0.018) ke kelompok kontrol positif (dengan ovariektomi) (3.38 ± 0.204). adanya perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA otak antara kelompok kontrol positif (*Rattus norvegicus* hipoestrogen) (3.38 ± 0.204^a) dengan kelompok perlakuan pemberian estradiol dosis 0.18 mg/kg/BH/hr (3.07 ± 0.208^{bc}), kelompok perlakuan 1 dengan pemeberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 1.25 mg/kg BB/hr (3.11 ± 0.164^{bc}), kelompok perlakuan 2 dengan pemeberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 2.5 mg/kg BB/hr (3.09 ± 0.148^{bc}), dan kelompok perlakuan 3 dengan pemeberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 5 mg/kg BB/hr (2.86 ± 0.142^c). Hal ini berarti ada pengaruh dari perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak berbagai dosis berupa penurunan kadar MDA. Melalui uji *Pearson* yang dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan kadar MDA otak di dapatkan keeratan yang bermakna dengan *p-value* lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ (*p value 0.002*). Keeratan hubungan antara pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan kadar MDA otak dalam kategori toleransi yang kuat (-0.707).

Berdasarkan hasil uji perbandingan berganda sengan uji LSD ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA antara kelompok kontrol positif (tikus yang di ovariektomi) (9.2 ± 2.52^a) dengan perlakuan perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hari (4.84 ± 1.85^b), 2.5 mg/kgBB/hari (3.1 ± 1.62^{bc}), dan 5 (1.01 ± 0.44^c) mg/kgBB/hari. Hal ini berarti bahwa perlakuan pemberian ekstrak etanol kacang tunggak dosis 1.25/kgBB/hari mg, 2.5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari memiliki pengaruh terhadap ekspresi *Amyloid β* . Sehingga dapat dikatakan bahwa perlakuan pemberian ekstrak etanol kacang tunggak berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap penurunan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih tua yang di ovariektomi.

Dapat disimpulkan bahwa pemberian ethanol kacang tunggak dalam berbagai dosis dapat menurunkan kadar MDA dan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus tua (*Rattus norvegicus*) yang di ovariektomi.



SUMMARY

Effect of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Ethanol Extract on Decrease in Malondialdehyde Levels and Amyloid β Expression in White Rat (*Rattus norvegicus*) Brain Ovariectomy Model, Master Program in Midwifery, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Chair of Supervisory Commission: Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K) ; Member: Dr. dr. Dwi Yuni Hidayati, M. Kes.

Menopause can cause a decrease in quality of life and cause health problems. The state of menopause has long-term side effects, one of which is dementia, which is dominated by Alzheimer's disease. In 2016 there were 700,000 deaths due to Alzheimer's disease. The decrease in the hormone estrogen during menopause is believed to be a trigger for oxidative stress in the brain that causes neuronal cell damage to the onset of Alzheimer's. Oxidative stress occurs when the production of Reactive Oxygen Species (ROS) produced by brain mitochondria is not matched by the production of antioxidants as an antidote. Oxidative stress that occurs in the brain can be characterized by increased lipid peroxidation which produces malondialdehyde. ROS are highly reactive compounds that can damage proteins, DNA, and lipids such as Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). Lipid peroxidation occurs when free radicals such as OH attack Hydrogen from Fatty Acid (LH) and produce Radical Lipid (L•). Furthermore, L• reacts with O₂ molecules and forms Radical Peroxyl Lipid (LOO•). LOO• undergoes a cyclization reaction to form endoperoxides, which ultimately form MDA.

Alzheimer's disease is a disease caused by a build-up of amyloid peptide that forms plaques in the brain that disrupt synapse function and result in neuronal death. Amyloid is believed to trigger cell membrane damage so that it disrupts the balance of Ca²⁺ in mitochondria. This can induce excessive ROS production and cause neuronal cell damage that causes Alzheimer's. Reduced estrogen hormone in postmenopausal women results in reduced endogenous antioxidants that can prevent neuronal cell damage induced by increased ROS. The hormone estrogen has the ability to induce the production of endogenous antioxidants needed to prevent oxidative stress. Drugs given to people with Alzheimer's have unwanted side effects such as insomnia, gastritis and others. Cowpea is a plant that contains phytoestrogen compounds which are dominated by genistein. Genistein has structural similarities to endogenous estrogens. Genistein helps increase the expression of antioxidant enzymes naturally, so that ROS can be deactivated. So it is hoped that it can prevent the occurrence of oxidative stress that can cause Alzheimer's in menopausal women. The purpose of this study was to prove that cowpea (*Vigna unguiculata*) ethanol extract could reduce malondialdehyde (MDA) levels and amyloid expression in the brains of old white rats (*Rattus norvegicus*) ovariectomized model. The method used is experimental post test control design. The samples used were female rats (*Rattus norvegicus*) which were conditioned by hypoestrogen by ovariectomy so that they resembled menopause. The number of replications in this study were 6 replications with 1 positive control group, 1 negative control group, 1 estradiol group, 1 group receiving cowpea ethanol extract at a dose of 1.25 mg/kg/day, 1 group receiving 2.5 mg cowpea ethanol extract /kgbw/day, and 1 group with cowpea ethanol extract at a dose of 5mg/kgbw/day. MDA levels were measured by ELISA and Amyloid expression was measured by immunofluorescence observation. Statistical data analysis using One Way Anova followed by Multiple Comparison in the form of Least Significant Different (LSD).

The results of the Shapiro-Wilk test for data normality showed that MDA levels and Amyloid expression for each observation group had shown p-values, all of which had values greater than the significance level $\alpha = 0.005$, so all data had met the parametric prerequisite test. Based on the results of the multiple comparison test with the LSD test, it showed that there was an increase in the mean MDA levels of the negative control group (without ovariectomy) (3.18 ± 0.018) to the positive control group (with ovariectomy) (3.38 ± 0.204). there was a significant difference in the mean brain MDA levels between the positive control group (*Rattus norvegicus* hypoestrogen) (3.38 ± 0.204^a) and the treatment group given estradiol at a dose of 0.18 mg/kg/BW/day (3.07 ± 0.208^{bc}), treatment group 1 was given the

extract. cowpea ethanol at a dose of 1.25 mg/kg BW/day (3.11 ± 0.164^{bc}), treatment group 2 was given cowpea ethanol extract at a dose of 2.5 mg/kg BW/day (3.09 ± 0.148^{bc}), and treatment group 3 was given cowpea ethanol extract at a dose of 5 mg/kg BW/day (2.86 ± 0.142^a). This means that there is an effect of the treatment of cowpea ethanol extract in various doses in the form of a decrease in MDA levels. Through the Pearson test conducted to determine the close relationship between cowpea ethanol extract and brain MDA levels, it was found that there was a significant closeness with a p-value smaller than the significance level $\alpha = 0.05$ (p value 0.002). The close relationship between cowpea ethanol extract and brain MDA levels was in the category of a strong correlation (-0.707).

Based on the results of the multiple comparison test with the LSD test, there was a significant difference in the mean MDA levels between the positive control group (ovariectomized rats) ($9.2 \pm 2.52a$) and the treatment with cowpea ethanol extract at a dose of 1.25 mg/kgBW/day (4.84 ± 1.85). b), 2.5 mg/kgBW/day ($3.1 \pm 1.62bc$), and 5 ($1.01 \pm 0.44c$) mg/kgBW/day. This means that the treatment of cowpea ethanol extract at doses of 1.25/kgBW/day mg, 2.5 mg/kgBW/day, and 5 mg/kgBW/day had an effect on the expression of Amyloid. So it can be said that the treatment of cowpea ethanol extract in various doses had a significant effect on the decrease in amyloid expression in the brains of old white rats that were ovariectomized.

It can be concluded that the administration of cowpea ethanol in various doses can reduce MDA levels and Amyloid expression in the brains of old rats (*Rattus norvegicus*) that were ovariectomized.



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur kehadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul : Pengaruh Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* dan Ekspresi *Amyloid β* pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariectomi.

Dengan selesainya tesis ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani AR, MS, selaku Rektor Universitas Brawijaya Malang beserta segenap jajarannya atas kesempatan dan fasilitas pendidikan yang diberikan selama menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med., Sp.A(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, atas izin yang diberikan selama penulis dapat menempuh pendidikan di Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Sutrisno, Sp.OG(K) selaku Ketua Program Studi Magister Kebidanan yang telah memberikan dukungan selama menempuh pendidikan Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. Dr. dr. I Wayan Arsana Wiyasa, SpOG(K) selaku pembimbing 1 yang telah memberikan bimbingan dan masukan selama proses penyusunan tesis ini.
5. Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M. Kes selaku pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan, masukan dan arahan demi kesempurnaan tesis ini.
6. Prof. Dr. dr. Nurdiana, M. Kes selaku penguji 1 yang telah bersedia memberikan masukan dan arahan dalam tesis ini.

7. Dr. Hushul Khotimah, S. Si., M. Kes selaku penguji 2 yang telah bersedia memberikan masukan dan arahan dalam tesis ini.
8. Segenap staf administrasi Program Studi Magister Kebidanan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
9. Bapak, Ibu, Suami dan keluarga besar yang selalu mendoakan, memberi dukungan dan semangat selama proses penyusunan tesis ini.
10. Kelompok tesis yang saya banggakan Elisa Danik K, Ni Putu Sri Hariyati dan teman-teman Magister Kebidanan angkatan 2019 sebagai teman seperjuangan yang saling mendukung dan memotivasi satu dengan yang lainnya.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan ada kekurangtepatan, oleh karena itu penulis mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Agustus 2021

Penulis

DAFTAR ISI

LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS.....	iv
RINGKASAN.....	vi
SUMMARY.....	viii
KATA PENGANTAR.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Menopause.....	7
2.2 Alzheimer.....	9
2.3 Amyloid β	11
2.4. Radikal Bebas, <i>Reactive Oxygen Species</i> dan <i>Malondialdehyde</i>	15
2.4. <i>Malondialdehyde</i> (MDA).....	18
2.5. Antioksidan.....	21
2.6. Kacang Tunggak.....	22
2.7. Genistein.....	27
2.7. Tikus Putih.....	33
BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN.....	36
3.1 Kerangka Teori.....	36
3.2 Kerangka Konsep.....	39
3.3 Hipotesis.....	41
BAB 4 METODE PENELITIAN.....	42
4.1 Jenis dan Desain Penelitian.....	42
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	43

4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	46
4.4	Variabel Penelitian	46
4.5	Defenisi Operasional	47
4.6	Prosedur Penelitian	48
4.7	Alur Penelitian	58
4.8	Analisa Data	59
BAB 5 HASIL PENELITIAN		61
5.1	Kataristik Penelitian	61
5.2	Hasil Uji Prasyarat Parametrik	62
5.3	Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak Terhadap Kadar MDA pada Otak Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Ovariektomi	62
5.4	Pengaruh Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Ekspresi Amyloid β pada Otak Tikus Putih Model Ovariektomi	67
BAB 6 PEMBAHASAN		71
6.1	Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>) terhadap Kadar MDA Otak Pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) model Ovariektomi	71
6.2	Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>) terhadap Ekspresi Amyloid β Otak Pada Tikus Putih (<i>Rattus</i> <i>norvegicus</i>) model Ovariektomi	74
6.3	Keterbatasan Penelitian	77
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		78
7.1	Kesimpulan	78
7.2	Saran	78
DAFTAR PUSTAKA		79
LAMPIRAN		83
RIWAYAT HIDUP		89

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Nama <i>Vigna unguiculata</i> dalam berbagai bahasa	23
Tabel 2. 2 Komposisi Mineral dan Vitamin	26
Tabel 4. 1 Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan	45
Tabel 4. 2 Tempat Penelitian	46
Tabel 5. 1 Hasil Uji Normalitas Data	62
Tabel 5. 2 Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak Terhadap Kadar MDA pada Otak Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Ovariektomi	63
Tabel 5. 3 Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak Terhadap Ekspresi <i>Amyloid β</i> pada Otak Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Ovariektomi	68



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Gambaran Perbandingan kadar <i>Follicle-Stimulating Hormon</i> (FSH), <i>Luteinizing Hormone</i> (LH), konjugat estron (E1C), dan progesteron Diglucuronide (PDG) antara wanita perimenopasue dan wanita reproduktif	7
Gambar 2. 2 Perubahan neuron yang sehat dan yang sakit pada Alzheimer.	10
Gambar 2. 3 Tampilan skematis APP dalam pembentukan <i>Amyloid β</i>	12
Gambar 2. 4 Proses terbentuknya pori pada membran akibat oligomer <i>Amyloid β</i> pada neuron	14
Gambar 2. 5 Produksi ROS di mitokondria selama fosforilasi oksidatif dan mekanisme antioksidan.....	17
Gambar 2. 6 Skema sederhana yang menggambarkan serangan Spesies Oksigen Reaktif (ROS).....	20
Gambar 2. 7 Gambar Kacang Tunggak <i>Vigna unguiculata</i>	24
Gambar 2. 8 Klasifikasi Phytoestrogen	27
Gambar 2. 9 Struktur kimia dari genistein dan Estradiol	28
Gambar 2. 10 Mekanisme Geneistein dalam melindungi neuron.....	32
Gambar 3. 1 Kerangka Teori	36
Gambar 3. 2 Kerangka Konsep Penelitian.....	39
Gambar 4. 1 Alur Penelitian.....	58
Gambar 5. 1 Histogram Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tuggak (<i>Vigna unguiculata</i>) terhadap kadar MDA otak pada <i>Rattus norvegicus</i> yang ovariektom.....	65
Gambar 5. 2 Ekspresi <i>Amyloid β</i> diamati dengan mikroskop <i>Immunofloresene</i> dengan perbesaran 400x.....	67
Gambar 5. 3 Histogram Pengaruh Ekstrak Etanol Ekstrak Kacang Tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>) terhadap Ekspresi <i>Amyloid β</i> Otak pada <i>Rattus norvegicus</i> model Ovariektomi.....	69

DAFTAR SINGKATAN

$^{1}O_2$: Singlet Oxygen
APP	: Amyloid Precursor Protein
ATP	: Adenine Triphosphate
Ca^{2+}	: Ion Kalsium
CNS	: Central Nervous System
CSF	: Cerebro Spinal Fluid
Cu^{2+}	: Copper Ion
ER	: Estrogen Reseptor
Fe^{2+}	: Iron Ion
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
H_2O_2	: Hidrogen Peroxide
HOBr	: Hypobromous acid
HOCL	: Hypochlorous acid
L^{\bullet}	: Radical Lipid
LOO^{\bullet}	: Radikal peroksil lipid
LPO	: Lipoperoksidasi
MDA	: Malodiadehyde
MRI	: Magnetic Resonance Imaging
NFT	: Neurofibrillary Tangles
NO	: Nitric Oxide
O_2	: Oksigen
O_2^{\bullet}	: Superoxide
O^3	: Ozone
OH^{\bullet}	: Hydroxyl

PTP : *Permeability Transition Pore*

PUFA : *Polyunsaturated Fatty Acids*

RNS : *Reactive Nitrogen Species*

ROOH : *Organic Peroxide*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SO : *Stess Oksidatif*

UHH : *Usia Harapan Hidup*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Keterangan Laik Etik.....	83
Lampiran 2 Keterangan Bebas Plagiasi.....	84
Lampiran 3 Keterangan Accepted Jurnal.....	85
Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian.....	86



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Usia Harapan Hidup (UHH) di Indonesia terus meningkat setiap tahunnya.

Data dari Badan Statistik (2013) pada tahun 2017 menunjukkan UHH berada pada usia 71.06 tahun, tahun 2018 naik menjadi 71.20 tahun, dan pada tahun 2019 terus meningkat menjadi 71,34 tahun (Statistik, 2013). Meningkatnya jumlah UHH berdampak pada meningkatnya populasi wanita menopause. Menopause umumnya terjadi pada rentan usia 51-52 tahun. Pada masa ini terjadi penurunan produksi hormon estrogen menyebabkan berhentinya siklus menstruasi pada wanita dan terjadi bersamaan dengan proses penuaan secara alami (Deficiency & Lobo, 2018)

Wiyasa (2019) menyatakan berkurangnya hormon estrogen pada menopause dapat menyebabkan terjadinya penurunan kualitas hidup dan menimbulkan masalah kesehatan. Efek samping jangka pendek dari menopause dapat berupa gejala vasomotor seperti *hot flushes*, keringat malam, jantung berdebar, maupun sakit kepala. Sementara efek samping jangka panjang yang timbul akibat menopause salah satunya adalah penyakit Neurologis seperti Demensia (Podfigurna-Stopa *et al.*, 2016).

Alzheimer merupakan penyakit neurologis yang paling sering menyebabkan terjadinya Demensia. Penderita Alzheimer pada tahap awal akan mengalami gangguan dalam mengingat informasi baru karena degenerasi dari sinapsis dan kematian neuron pada hipokampus. Sementara pada tahap yang lebih parah penderita Alzheimer akan membutuhkan bantuan orang lain untuk mengerjakan aktivitas sehari-hari seperti mandi, makan, bahkan menyebabkan kematian

(Wojsiat *et al.*, 2018). Pada tahun 2016 terdapat 700.000 kematian yang disebabkan oleh penyakit Alzheimer dan penderita Alzheimer lebih banyak diderita oleh wanita dengan jumlah kematian tersebut diperkirakan lebih banyak daripada yang dilaporkan (Gaugler *et al.*, 2016).

Penuaan yang terjadi pada menopause berakibat pada berkurangnya hormon estrogen yang dipercaya dapat meningkatkan resiko penyakit Alzheimer (Tönnies & Trushina, 2017). Hal ini disebabkan hormon Estrogen berfungsi meningkatkan enzim antioksidan alami di dalam tubuh seperti glutathione peroksidase yang dapat mencegah terjadinya Stres Oksidatif (SO) (Montoya-

estrada *et al.*, 2020). Ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan atau radikal di dalam tubuh merupakan penyebab terjadinya SO. Otak secara alami memproduksi radikal melalui proses metabolismenya untuk mengasilkan *adenine triphosphate* (ATP) di mitokondria. Sementara itu, proses metabolisme ini menghasilkan radikal yang dapat berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan/atau *Reactive Nitrogen Species* (RNS). Namun penurunan hormone estrogen yang terjadi pada masa menopause mengakibatkan peningkatan jumlah oksidan yang dapat meningkatkan resiko terjadinya Alzheimer (Agarwal *et al.*, 2012).

Proses metabolisme untuk menghasilkan ATP yang terjadi di pada sel neuron membutuhkan hampir 98% molekul Oksigen (O_2) yang kemudian direduksi menjadi $O_2^{\bullet-}$ dan Hidrogen Peroksida (H_2O_2). Reduksi dari H_2O_2 selanjutnya akan menghasilkan Hydroxyl (OH^{\bullet}) yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan Lipid. Jumlah OH^{\bullet} yang meningkat di dalam otak dapat mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid terjadi saat radikal bebas yang berlebihan di dalam sel neuron menyerang hidrogen dari gugus Methylene (CH_2) pada asam lemak (LH) akibatnya terjadi pembentukan radikal lipid (L^{\bullet}). Molekul L^{\bullet} yang ada akan bereaksi dengan molekul oksigen dan menghasilkan radikal peroksil lipid (LOO^{\bullet}). Melalui reaksi siklisasi LOO^{\bullet} kemudian menghasilkan *Malondialdehyde*

(MDA) sebagai hasil akhir dari proses peroksidasi lipid (Phaniendra *et al.*, 2015)

Sementara otak merupakan organ yang kaya kandungan *Polyunsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang rentan mengalami SO dan peroksidasi lipid yang mempengaruhi fungsi membran hingga menyebabkan neurodegeneratif. Selain itu, radikal lain seperti RNS juga dapat yang dapat menyebabkan kerusakan sel dengan mereduksi *Nitric Oxide* (NO). Berlebihnya jumlah Oksidan di otak dipercaya menyebabkan terjadinya SO bahkan menyebabkan terjadinya kematian sel neuron pada penderita Alzheimer (Huang *et al.*, 2016).

Sebuah penelitian menyatakan bahwa penyebab Alzheimer disebabkan penumpukkan peptida *Amyloid β* yang membentuk plak di dalam otak. *Amyloid β* dipercaya dapat mengakibatkan pembentukan pori pada membran sel sehingga mengganggu keseimbangan Ca^{2+} pada mitokondria. Berlebihnya kandungan Ca^{2+} dapat meningkatkan terjadinya apoptosis pada sel neuron. Proses ini terjadi ketika Peptida *Amyloid β* bersatu menjadi plak di dalam membran kemudian menjangkau *lipid bilayer*, dan membuat pori yang berfungsi sebagai saluran ion sensitif Ca^{2+} . *Amyloid β* juga dapat mengurangi fungsi synaps dalam menghantarkan signal. Hal inilah yang menjadi awal mula terjadinya gangguan kognitif ringan pada penyakit Alzheimer (Reiss *et al.*, 2018).

Penuaan dan menopause pada wanita menjadi faktor resiko terjadinya Alzheimer. Penderita Alzheimer sendiri biasanya berumur 65 tahun bahkan lebih. Meskipun demikian, Alzheimer bukanlah hal normal yang terjadi pada penuaan. Hingga saat ini Alzheimer dianggap sebagai masalah kesehatan yang di alami oleh wanita menopause. Penanganan masalah kesehatan yang terjadi pada wanita menopause dilakukan dengan penanganan terapi hormon. Meskipun pemberian terapi hormon estrogen dapat menunda terjadinya penyakit Alzheimer pada wanita menopause, tetapi terapi ini memiliki keterbatasan seperti menginduksi proliferasi dan menghasilkan efek onkogenik pada sel nonneuron. (Warner *et al.*, 2017).

Hingga saat ini belum ditemukan terapi yang efektif untuk menyembuhkan penyakit Alzheimer. Obat-obatan yang diberikan kepada penderita Alzheimer memiliki efek samping yang tidak diharapkan seperti gastrointestinal seperti mual, diare, dan sakit perut, inkontinensia urin dan insomnia. Selain karena tidak menyembuhkan Alzheimer efek samping ini justru dapat mengurangi kualitas hidup dan meningkatkan masalah kesehatan wanita menopause (Khan *et al.*, 2020).

Untuk mengatasi masalah kesehatan pada menopause Genistein dapat dipertimbangkan sebagai pengganti hormon estrogen endogen yang hilang.

Genistein memiliki kemiripan struktural dengan estrogen dan merupakan agonis Estrogen Reseptor β (ER β) yang relatif selektif. Dengan pengikatan Genistein ke ER β diharapkan dapat meningkatkan memori dan berkontribusi pada efek pelindung neuron pada penderita Alzheimer. Genistein memiliki basis cincin fenolik dan jarak yang sama antara gugus 4'- dan 7'- hidroksil dengan estrogen alami di dalam tubuh. Selain itu dengan meningkatkan hormon estrogen, Genistein membantu meningkatkan ekspresi enzim antioksidan secara alami, sehingga ROS dapat dinonaktifkan. Cara ini juga dipercaya dapat mencegah terjadinya SO yang dapat menyebabkan Alzheimer pada wanita menopause. (Sureda *et al.*, 2017).

Selain dapat mencegah terjadinya SO melalui modulasi jalur estrogen, Genistein secara signifikan dapat menekan gangguan pengenalan spasial jangka pendek yang diinduksi oleh *Amyloid β* (Bakhtiari *et al.*, 2017).

Kacang Tunggak dengan nama ilmiah *Vigna unguiculata* merupakan tanaman jenis kacang-kacangan yang mengandung isoflavon dan berperan penting untuk kesehatan (Sureda *et al.*, 2017). Genistein merupakan jenis isoflavon utama yang terdapat pada kacang tunggak yang mampu menjaga neuron dengan mencegah kerusakan oksidasi yang diinduksi oleh ROS maupun *Amyloid β* . Sebuah penelitian pada hewan coba tikus telah dilakukan untuk

membuktikan terapi menggunakan genistein (0,375 µg/mL). Hasilnya Geneitsein yang telah diberikan secara signifikan melindungi sel neuron pada hipokampus tikus (Devi *et al.*, 2017). Berdasarkan penjabaran masalah diatas peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) Terhadap Penurunan Kadar *Malondialdehyde* Dan Ekspresi *Amyloid β* Pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Tua Model Ovariektomi.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* dan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) tua model ovariektomi?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

- Apakah ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi?
- Apakah ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* dan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi.

1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Membuktikan ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan kadar *Malondialdehyde* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi.
- b. Membuktikan ekstrak etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Menambah ilmu pengetahuan tentang efek fitoestrogen dari Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) sebagai antioksidan pada *Rattus norvegicus* model ovariektomi.

1.4.2 Manfaat Praktis

Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat dipertimbangkan sebagai alternatif untuk mencegah dan mengatasi efek jangka pendek maupun jangka panjang dari masa menopause, terutama penyakit Alzheimer.

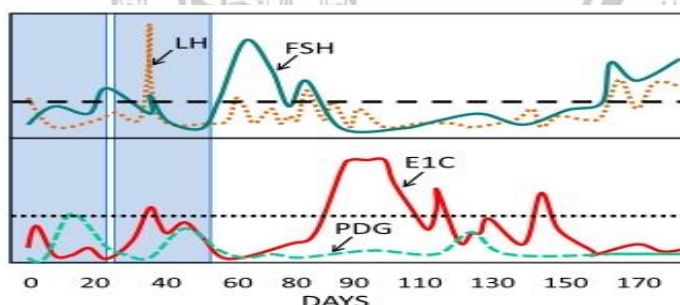
BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Menopause

2.2.1 Definisi Menopause

Menopause diartikan sebagai berakhirnya masa reproduksi pada wanita yang biasanya terjadi pada usia 51 tahun. Hal ini dapat terjadi secara alami karena penuaan maupun secara nonalami seperti tindakan ovariectomi. Dalam keadaan ini terjadi hilangnya sel germinal dan sel penghasil hormon yang berperan dalam proses menstruasi. Menopause pada wanita juga terjadi akibat dari berkurangnya folikel ovarium yang dimiliki akibat menurun secara drastis hormon estradiol (E2) dan meningkatnya hormon FSH (*Follicle Stimulating Hormone*) (Hall, 2015). Menjelang masa menopause wanita akan mengalami hipogonadisme dan hipogonadotropin yang menyebabkan berkurangnya cadangan ovum di ovarium. Hal ini yang menjadi penyebab terjadi perubahan fisiologis pada masa transisi seperti siklus menstruasi yang tidak teratur (Thornton & Chervenak, 2020).



Gambar 2. 1 Gambaran Perbandingan kadar Follicle-Stimulating Hormon (FSH), Luteinizing Hormone (LH), konjugat estron (E1C), dan progesteron Diglucuronide (PDG) antara wanita perimenopasue dan wanita reproduktif

Keterangan : Garis putus-putus di panel atas menunjukkan batas atas normal FSH wanita muda sedangkan garis putus-putus di panel bawah menunjukkan batas atas E1C normal pada wanita muda. Batang yang diarsir menunjukkan siklus di mana tingkat PDG konsisten dengan siklus ovulasi (Hall, 2015).

Peningkatan FSH pada menopause terjadi karena adanya penurunan hormon estrogen di dalam tubuh. Sehingga tubuh melalui GnRH tidak dapat mensekresi inhibin B di hipotalamus untuk menekan kenaikan FSH (Hall, 2015).

Penegakkan diagnosa menopause dapat dilakukan dengan pemeriksaan penunjang dari serum darah wanita. Seseorang dikatakan menopause jika didapatkan hasil pemeriksaan kadar FSH lebih dari 40 IU/mL dan/atau estradiol kurang dari 100 pmol/L (Hoekman *et al.*, 2018).

2.2.2 Hubungan Menopause dengan penyakit Alzheimer

Pada wanita menopause folikel pada ovarium tidak lagi di produksi secara permanen. Hal ini mengakibatkan hormon Estrogen menurun secara signifikan dan memicu munculnya gejala menopause seperti hot *flushes*, insomnia, gangguan kognitif, dan lainnya. Selain itu kadar hormon Estrogen yang berkurang dapat menyebabkan terjadinya perubahan dalam metabolisme yang menyebabkan penyakit Alzheimer (Raz, 2014).

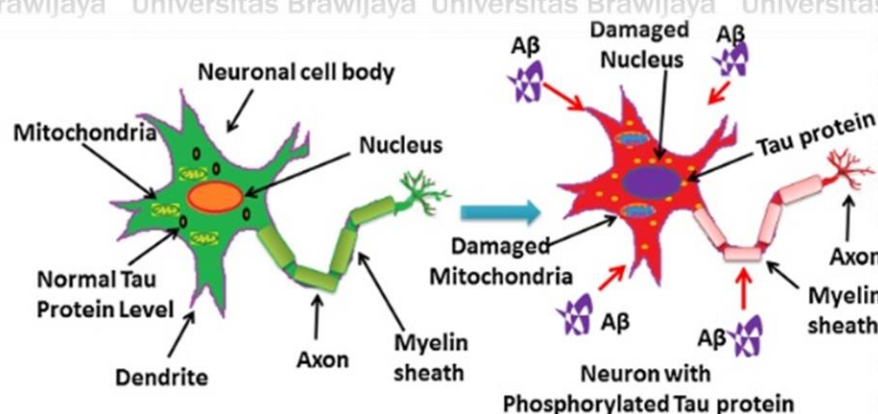
Sayangnya penurunan CMRglc menginduksi reaksi kekurangan adaptif untuk meningkatkan metabolisme asam lemak sebagai bahan alternatif dan pemanfaatan sebagai pembentukan energi menggantikan glukosa dan pemanfaatan badan keton oleh mitokondria. Hipometabolisme ini menyebabkan penurunan fungsi mitokondria dan kerusakan oksidatif yang dapat meningkatkan akumulasi patologi *Amyloid β* yang menyebabkan Alzheimer (Scheyer *et al.*, 2018).

2.2 Alzheimer

2.2.1 Definisi Alzheimer

Pada tahun 1906 untuk pertamakalinya Alzheimer diperkenalkan oleh Alois Alzheimer sebagai penyakit yang paling sering menyebabkan demensia dan paling banyak penderitanya adalah perempuan. Penyakit ini ditandai dengan adanya pengendapan protein abnormal yang membentuk *Amyloid β* (Valotassiou *et al.*, 2018). Pengendapan *Amyloid β* mengakibatkan terjadinya *Neurofibrillary Tangles* (NFT) pada neuron dan gangguan fungsi synaptik. Terganggunya synap dalam menjalankan fungsinya menghantarkan sinyal antar neuron dapat menyebabkan kematian sel neuron (Khan *et al.*, 2020).

Kematian sel neuron yang terjadi terus-menerus dapat menyebabkan aktivitas sehari-hari menjadi terganggu. Hal ini terjadi karena informasi-informasi yang diperlukan dalam kegiatan sehari-hari tidak dapat tersampaikan bahkan hilang. Gejala klinis awal yang sering terjadi meliputi kesulitan untuk mengingat percakapan, identitas dirinya, hingga peristiwa yang baru di alami maupun aktivitas yang sering dilakukan. Gangguan ini akan berlanjut ketahap disorientasi, kebingungan, perubahan perilaku utama, seperti agresi dan agitasi, dan gejala neuropsikiatri, seperti delusi dan halusinasi. Berdasarkan hasil pemeriksaan menggunakan *Magnetic Resonance Imaging* (MRI) dan hispatologi gangguan yang terjadi diakibatkan adanya penurunan aktivitas metabolik dan hilangnya neuron dimulai di korteks entorhinal dan hipokampus pada wilayah CA1 (Hung *et al.*, 2010; Atri, 2019).



Healthy Neuron

Diseased Neuron

Gambar 2. 2 Perubahan neuron yang sehat dan yang sakit pada Alzheimer.

Keterangan : Amyloid β menginduksi stres yang mengakibatkan kerusakan nukleus dan neuron (Kamat et al., 2016).

Dalam tahap yang sangat serius beberapa orang penyakit Alzheimer hanya bisa terbaring ditempat tidur dengan bantuan perawatan dalam waktu yang cukup lama (Gaugler et al., 2016). Alzheimer merupakan penyakit yang butuh perjalanan panjang dalam untuk memunculkan efek yang ditimbulkan. Organisasi Alzheimer Indonesia menyampaikan ada 10 tanda gejala awal yang dapat terjadi pada penderita Alzheimer, sebagai berikut :

- Gangguan daya ingat
- Sulit untuk fokus
- Sulit melakukan hal yang familiar yang biasa dilakuakn setiap hari
- Disorientasi seperti kebingungan pada tempat dan waktu
- Kesulitan memahami visospasial seperti membaca, memperkirakan jarak, bahkan tidak mengenali wajah sendiri.
- Gangguan Komunikasi seperti berhenti dan bingung melanjutkan kata-kata
- Menaruh barang tidak pada tempatnya
- Salah dalam membuat keputusan
- Menarik diri dari pergaulan
- Terjadi perubahan perilaku dan kepribadian.

Jika 10 tanda gejala ini terdeteksi melalui wawancara dengan penderita dan orang terdekat, pemeriksaan lebih lanjut akan dilakukan untuk menepis dugaan penyakit lain namun dengan gejala yang mirip, seperti defisit vitamin dan tumor.

2.3 Amyloid β

Amyloid β telah dikaitkan dengan 20 penyakit termasuk didalamnya adalah penyakit Alzheimer. Pada penyakit Alzheimer terjadi akibat terjadinya deposisi Amyloid β yang mengendap secara ekstra atau intraseluler di otak. Lebih dari 95% kasus Alzheimer merupakan kasus *late-onset*. Hingga saat ini belum diketahui secara pasti manfaat fisiologis dari Amyloid β dalam keadaan normal. (Otzen & Riek, 2019)

Alois Alzheimer menyatakan bahwa penyakit Alzheimer terjadi bukan semata karena adanya penyusutan volume otak. Alzheimer dipercaya terjadi karena adanya pengendapan dari Amyloid β (plak pikun). Pengendapan Amyloid β paling banyak terjadi pada hipokampus. Peptida Amyloid β . Pengendapan Amyloid β yang terjadi di otak pada bagian hipokampus, berbahaya bagi sel neuron. Oligomer dari Amyloid β dapat menyerang membran sel neuron yang menyebabkan disfungsi sel dan kematian sel. Selain dengan mekanisme tersebut Amyloid β dapat mengakibatkan disfungsi sel dengan mekanisme peningkatan ROS. Dalam keadaan normal Zinc dan Copper diperlukan otak untuk mengatur aktivitas synaps menjalankan fungsinya menghantarkan sinyal. Namun pada penderita Alzheimer jumlahnya meningkat menjadi tiga kali lipat lebih banyak. Sementara itu agregat dari Amyloid β pada penderita Alzheimer dapat berinteraksi dengan Copper dipercaya memiliki sifat beracun karena akan lebih mudah menghasilkan ROS (Cheignon *et al.*, 2018).

Amyloid β merupakan peptide residu yang dibentuk oleh APP (Amyloid Precursor Protein). APP sendiri merupakan protein transmembran tipe 1 yang di

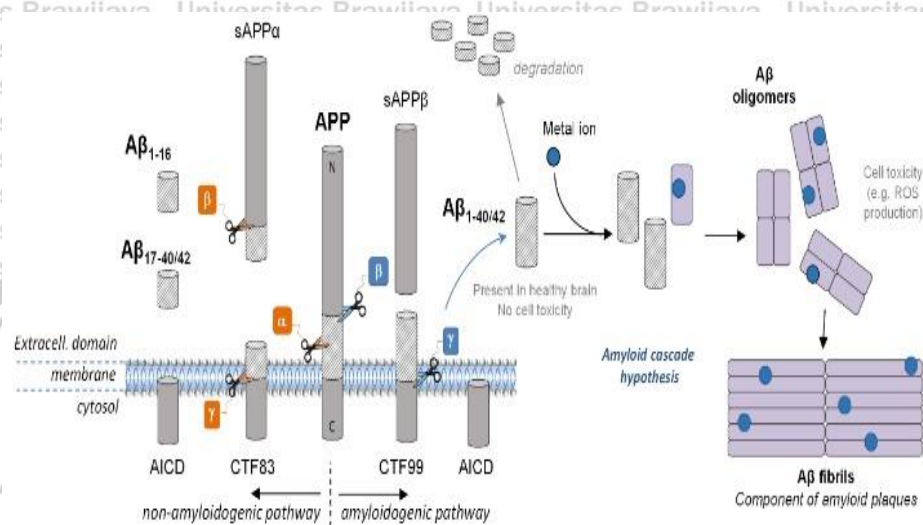
ekspresikan oleh berbagai jaringan terutama *Central Nervous System* (CNS).

Metsbolisme APP dapat terjadi melalui jalur non-amilogenik dan jalur amilogenik.

Proses tersebut dapat dilihat dan di jelaskan pada gambar 2.2. Akumulasi plak

Amyloid β disertai munculnya gangguan fungsi sinaptik, atrofi neuron hipokampus dan korteks serebral, demensia dan gangguan kognitif pada penderita Alzheimer

(Chuang *et al.*, 2018; Reiss *et al.*, 2018).



Gambar 2. 3 Tampilan skematis APP dalam pembentukan Amyloid β

Keterangan: Pada jalur non-amiloigenik, APP sekretase- α dan sekretase γ membentuk peptida $A\beta_{17-40/42}$ kemudian sekretase- β akan melakukan potongan untuk menghasilkan $A\beta_{1-16}$. Sementara dalam jalur amiloigenik APP secara berurutan dipotong oleh sekretase β -dan γ yang mengarah ke pembentukan peptida $A\beta_{1-40/42}$ (Cheignon *et al.*, 2018).

Proses pembentukan plak Amyloid β di otak terjadi ketika monomer

Amyloid berkumpul membentuk protofibril pendek yang fleksibel dan tidak teratur.

Kumpulan monomer Amyloid tersebut selanjutnya akan menjadi matur dan membentuk fibril tidak larut dengan struktur yang terus berulang dari untai β .

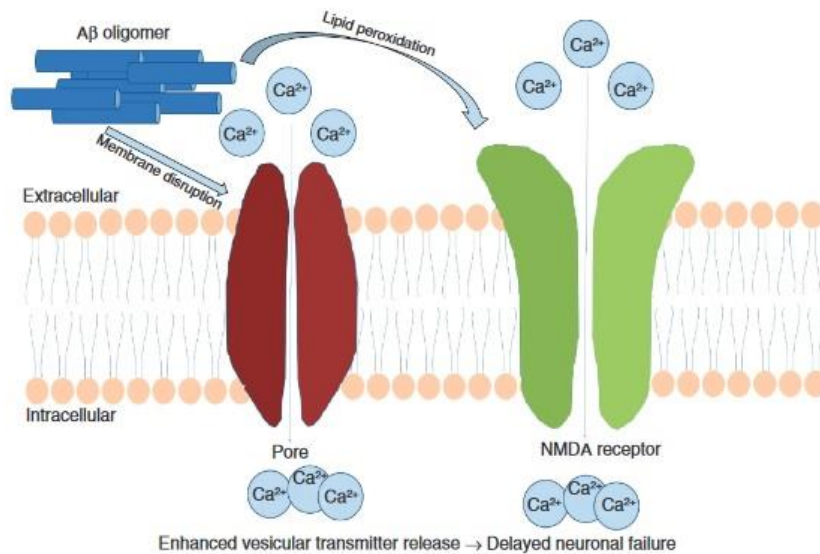
Selanjutnya agregat Amyloid β menjadi fibril pada ekstraseluler yang resisten terhadap pembelahan proteolitik di otak. Oligomer yang dibentuk oleh peptida

Amyloid β dianggap paling berbahaya untuk sel karena dapat berinteraksi dengan membran sel dan mengganggu keutuhan membran sel itu sendiri. Terutama

Amyloid β 1-42 dinilai lebih beracun dan lebih banyak menghasilkan ROS jika

dibandingkan dengan jenis *Amyloid β* lainnya. Hal ini ditunjukkan dalam sebuah penelitian dengan hewan coba tikus yang disuntikkan peptida *Amyloid*. Ditemukan hasil *Amyloid* yang teragregasi mengakibatkan terjadinya gangguan yang signifikan pada transmisi sinaptik, penurunan kognitif, dan kematian sel neuron (Huang *et al.*, 2016; Reiss *et al.*, 2018).

Toksisitas *Amyloid β* terhadap neuron terjadi akibat pembentukan pori pada membran. Pori pada membran terbentuk karena adanya oligomer *Amyloid* yang bersatu membentuk agregasi *Amyloid β* pada membran yang menjangkau lapisan ganda pada membran dan menghilangkan molekul lipid sehingga membentuk pori. berbahaya untuk membran karena dapat mengaktifasi saluran Ca^{2+} dan penipisan membran. Kerusakan yang terjadi pada sel neuron terjadi karena terganggunya homeostatis ion Kalsium (Ca^{2+}) pada sel. Hal ini terjadi akibat adanya pembentukan pori pada membran sel yang menyebabkan masuknya Ca^{2+} secara tidak terkontrol dan berlebihan di sitoplasma. Sebuah penelitian menunjukkan apoptosis pada neuron tikus dapat terjadi melalui kerusakan integritas DNA nuklear, mengurangi potensi membran mitokondria, dan dengan memicu lebih lanjut *downregulation bcl-2* dan upregulasi *p53*, *caspase*, dan *bax*. (Reiss *et al.*, 2018; Uddin & Kabir, 2019).



Gambar 2. 4 Proses terbentuknya pori pada membran akibat oligomer Amyloid β pada neuron

Keterangan: Oligomer Amyloid β memicu aktivasi NMDAR dan pembentukan pori-pori membran. Pembentukan pori dan aktivasi NMDA menyebabkan masuknya kalsium ke neuron dari ruang ekstraseluler. Peningkatan kadar kalsium intraseluler memicu pelepasan pemancar vesikuler, menghabiskan penyimpanan pemancar intraseluler yang dapat menyebabkan disfungsi neuron (Reiss et al., 2018).

Agregasi Amyloid β dapat menyebabkan SO, disfungsi mitokondria dan kegagalan energi sebelum terjadinya proses berkembangnya patologi plak Amyloid β . Hal ini terjadi akibat Agregasi Amyloid β dapat mengurangi respirasi mitokondria pada sel neuron dan astrosit melalui penghambatan kompleks I dan IV. Penghambatan *Electron Transport Chain* (ETC) yang terjadi berpotensi dapat menginduksi produksi ROS. Kombinasi produksi Ca^{2+} dan ROS di bawah stimulasi dari Amyloid β juga dipercaya menginduksi pembukaan *Permeability Transition Pore* (PTP) pada mitokondria dan memungkinkan Ca^{2+} untuk masuk dan menyebabkan kematian sel neuron. Pencegahan pembukaan PTP dengan menginduksi defisiensi *cyclophilin D* (penghambat molekul pembukaan PTP) juga meningkatkan fungsi mitokondria dan pembelajaran / memori pada model tikus AD yang menua. Stres oksidatif adalah salah satu pemicu utama patologi pada

penyakit Alzheimer, meskipun mitokondria terbukti menjadi target kerusakan oksidatif daripada sumber produksi ROS (Angelova & Abramov, 2018).

Stres Oksidatif yang terjadi pada neuron yang diinduksi ketidak seimbangan Ca^{2+} juga dipercaya menghasilkan Amyloid β . Dalam penelitian yang dilakukan Wang *et al.* (2021) melakukan pemeriksaan plak Amyloid β pada hipokampus dan korteks pada otak tikus untuk melihat patogenesis dan perkembangan penyakit Alzheimer. Didapatkan hasil peningkatan dengan perhitungan persentase piksel dari gambar ekspresi Amyloid β yang luar biasa dari tikus usia 6 bulan.

2.4. Radikal Bebas, *Reactive Oxygen Species* dan *Malondialdehyde*

2.4.1. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan produk dari metabolisme seluler yang dihasilkan secara fisiologis. Radikal bebas adalah molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit terluar dan bersifat reaktif. Radikal bebas memiliki jumlah elektron ganjil yang membuat senyawa radikal bebas tidak stabil, berumur pendek dan sangat reaktif. Karena sifat reaktifnya radikal bebas dapat mengabstraksi elektron dari senyawa lain untuk mencapai stabilitas. Sehingga molekul lain yang diserang menghilangkan elektronnya dan berubah menjadi radikal yang dapat mengakibatkan neurogenesis (Phaniendra *et al.*, 2015).

Meskipun radikal bebas memiliki fungsi sebagai sinyal molekul yang mengaktifkan respons stres yang bermanfaat dalam tubuh, namun radikal bebas dapat bereaksi dengan semua makromolekul dan menyebabkan modifikasi tiroksidatif dan disfungsi sel. Radikal bebas merupakan produk sampingan dari metabolisme aerobik, bersifat toksik dan dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dan disfungsi jaringan (Di Meo & Venditti, 2020). Produk dari radikal bebas dapat berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang berasal dari mitokondria, peroksisom, endoplasmik retikulum, sel fagosit, dan

lainnya. Sementara dari radikal bebas eksogen dapat berasal dari lingkungan seperti polusi, obat-obatan tertentu dan radiasi (Bodega *et al.*, 2019).

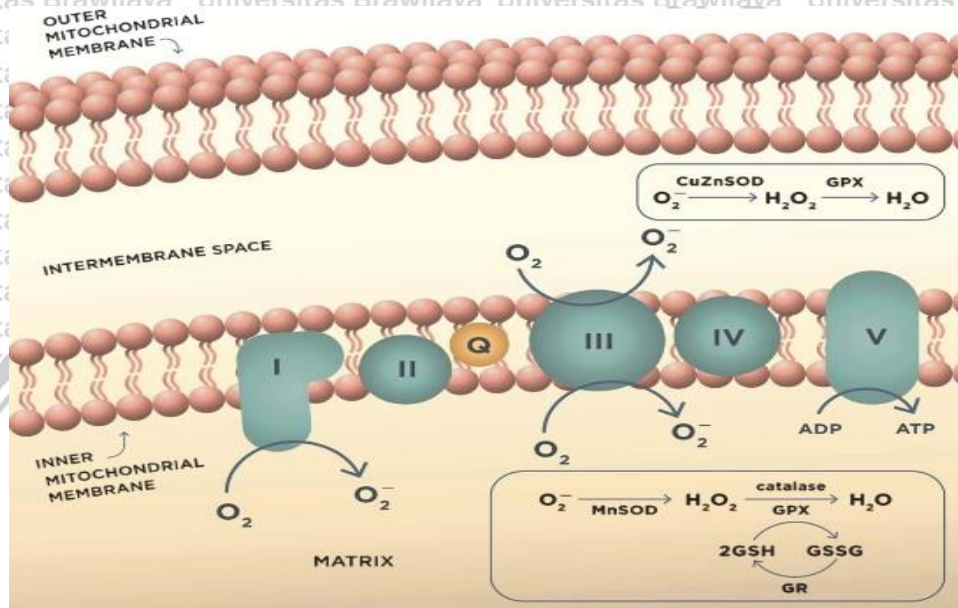
Dalam keadaan yang normal produksi radikal bebas yang rendah dapat dihilangkan oleh sistem pertahanan antioksidan dengan baik. Hal ini dilakukan sebelum radikal bebas mengakibatkan terjadinya kerusakan struktural dan fungsional pada sel. Namun saat jumlah radikal bebas tidak sebanding dengan antioksidan, mekanisme penghilangan ROS menjadi terganggu dan disebut Stres Oksidatif (SO). Hal inilah yang menginduksi terjadinya kerusakan DNA, peningkatan Ca^{2+} bebas intraseluler, kerusakan protein dan peroksidasi lipid yang dapat mengakibatkan terjadinya apoptosis pada sel neuron (Di Meo & Venditti, 2020).

2.4.2. Reactive Oxygen Species (ROS)

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah antioksidan yang dapat ditemukan di dalam sel dan bersifat oksidan atau pro oksidan. ROS merupakan radikal bebas yang dihasilkan selama reaksi metabolisme yang berasal dari Oksigen (O_2). ROS dapat diklasifikasikan menjadi dua kelompok senyawa yaitu; radikal dan non-radikal. ROS dalam kelompok radikal merupakan spesies yang mengandung paling tidak satu elektron tidak berpasangan di kulit sekitar inti atom dan memiliki kemampuan hidup secara independen. Produk ROS yang termasuk dalam kelompok radikal termasuk Superoxide ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Hydroxyl (OH^{\bullet}), Alkoxy radical (RO^{\bullet}), Peroxyl radical (ROO^{\bullet}). Sementara ROS dalam kelompok non radikal meliputi Hidrogen peroksida (H_2O_2), Oksigen singlet ($^1\text{O}_2$), Ozon (O_3), Hypochlorous acid (HOCl), dan Hypobromous acid (HOBr) (Phaniendra *et al.*, 2015).

ROS merupakan produk sampingan yang dihasilkan mitokondria dalam proses metabolisme untuk menghasilkan ATP. ROS yang dihasilkan biasanya dalam bentuk $\text{O}_2^{\bullet-}$ dan H_2O_2 . Fungsi dari ATP yang dihasilkan oleh mitokondria pada sel neuron diperlukan *synaps* sebagai energi untuk menyebarkan sinyal

listrik atau kimia dari satu sel neuron lainnya. produksi ATP mitokondria mempertahankan berbagai fungsi penting pada sinapsis seperti mempertahankan gradien ion melintasi membran sel, (Tönnies & Trushina, 2017). Sehingga saat terjadi disfungsi mitokondria synaps akan mengalami kegagalan menyampaikan impuls.



Gambar 2. 5 Produksi ROS di mitokondria selama fosforilasi oksidatif dan mekanisme antioksidan

Keterangan: Mitokondria memproduksi ROS saat fosforilasi oksidatif dan mekanisme antioksidan. Kompleks I dan kompleks III rantai transpor elektron mitokondria merupakan tempat utama produksi $O_2^{\bullet -}$ dalam respirasi aerobik. Selanjutnya $O_2^{\bullet -}$ diubah menjadi H_2O_2 oleh MnSOD atau CuZnSOD di ruang antarmembran.

Rantai transpor elektron dari mitokondria mengonsumsi hampir 98% oksigen molekuler di kompleks sitokrom oksidase dan menyisakan oksigen yang direduksi menjadi $O_2^{\bullet -}$ dan H_2O_2 , hal inilah salah satu penyebab sel neuron pada otak rentan mengalami SO. Ketika produksi $O_2^{\bullet -}$ dan H_2O_2 terjadi secara berlebihan ditambah dengan adanya Fe^{2+} atau Cu^{2+} pada neuron, produk ROS tersebut dapat mengakibatkan kerusakan jaringan yang seringkali melibatkan pembentukan OH^{\bullet} yang sangat reaktif terhadap lipid. Selain itu otak yang kaya dengan kandungan lipid rentan terhadap peroksidasi dan merupakan organ dengan kebutuhan oksigen yang tinggi. Hal ini diperparah dengan Cerebro

Spinal Fluid (CSF) yang tidak dapat mengikat Fe yang dilepaskan. Akibatnya, SO pada CNS dapat merusak otak secara serius melalui beberapa mekanisme interaksi, termasuk peningkatan Ca^{2+} bebas intraseluler, pelepasan asam amino eksitatori, dan neurotoksisitas (Huang *et al.*, 2016).

Otak merupakan organ dengan prevalensi mitokondria 3-5 kali lebih banyak jika dibandingkan dengan mitokondria pada organ tubuh lainnya. Selain menghasilkan ATP dalam metabolismenya, mitokondria juga menghasilkan produk sampingan berupa ROS. Hal inilah yang mengakibatkan kerusakan neuron sangat mungkin terjadi akibat berlebihnya oksidan yang tidak diimbangi dengan antioksidan atau sering disebut SO (Raz, 2014). Produksi ROS dalam jumlah banyak dan tidak terkendali dipercaya menjadi penyebab penyakit Alzheimer. Hal ini terjadi karena saat terjadi SO dapat terjadinya kesalahan pada enzim transpor elektron di mitokondria pada sel neuron. Sehingga terjadi defisiensi oksidase sitokrom c yang menyebabkan peningkatan produksi ROS, pengurangan penyimpanan energi, dan gangguan dalam metabolisme energi sel neuron. Disfungsi sel akibat terjadinya SO juga dapat disebabkan karena akumulasi Amyloid β pada otak. Oligomer Amyloid β yang terdapat di otak dapat mengdegradasi membran (Gambar 2.3) dan yang akhirnya menyebabkan kematian sel neuron akibat berlebihnya ion Kalsium didalam sel neuron pada penderita Alzheimer (Kamat *et al.*, 2016).

2.4. **Malondialdehyde (MDA)**

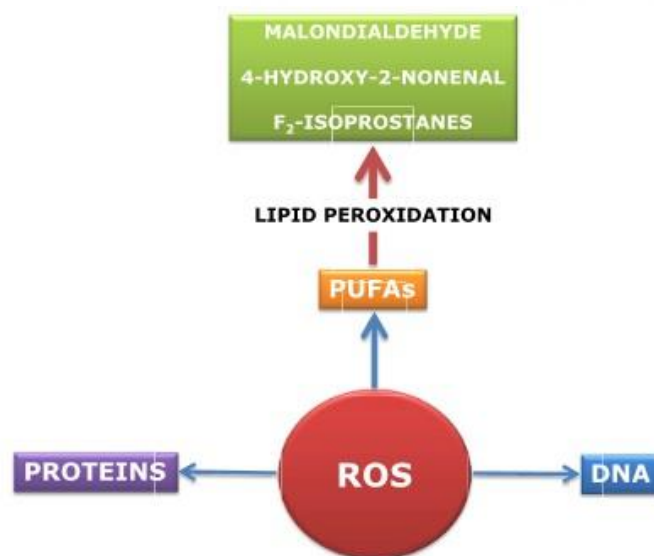
Polar lipid adalah komponen struktural dari membran sel. Polar lipid berfungsi dalam pembentukan penghalang permeabilitas sel dan organel subseluler dalam bentuk lapisan ganda lipid. Membran lipid memiliki fungsi penting dalam mengontrol keadaan fisiologis organ membran dengan memodifikasi aspek biofisiknya, seperti polaritas dan permeabilitasnya akibat pembentukan pori pada

membran. Pori pada membran dapat terbentuk hilang atau rusaknya molekul lipid sehingga membentuk pori. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan pada sel neuron akibat terganggunya homeostatis ion Kalsium (Ca^{2+}) pada sel. Selain itu pensinyalan lipid dapat terjadi melalui aktivasi berbagai reseptor, termasuk gabungan protein G dan *nuclear receptors*. Anggota dari beberapa kategori lipid yang berbeda telah diidentifikasi sebagai molekul transduksi sinyal intraselularis yang poten (Ayala *et al.*, 2014; Reiss *et al.*, 2018)

MDA juga memiliki peran sebagai pembawa sinyal dan pengatur ekspresi gen. Sebuah penelitian menunjukkan bahwa MDA bertindak sebagai *Glucose Stimulated Insulin Secretion* (GSIS) yang membawa sinyal dan mengatur sekresi insulin melalui jalur Wnt. Kadar MDA yang tinggi (5 dan $10\mu\text{M}$) dapat mempromosikan GSIS, peningkatan rasio ATP/ADP dan tingkat Ca^{2+} sitosol (Gambar 2.3), dan mempengaruhi ekspresi gen dan produksi protein/aktivitas dari regulator kunci GSIS. Selain itu penyisipan *Amyloid β* ke dalam membran sel melalui kimia Fenton, peroksida lipid dan produk degradasi seperti MDA (Ayala *et al.*, 2014; Gaschler & Stockwell, 2017).

Penumpukkan ROS dan akumulasi plak *Amyloid β* yang terdapat di otak menjadi penyebab terjadinya penyakit Alzheimer. ROS merupakan senyawa yang sangat reaktif dan dapat menyerang sekitarnya termasuk protein, DNA, dan lipid seperti Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). Reaksi yang terjadi antara ROS dan lipid disebut dengan Peroksidasi Lipid. Peroksidasi lipid terjadi saat radikal bebas seperti OH^{\bullet} menyerang Hidrogen dari *Fatty Acid* (LH) dan menghasilkan *Radical Lipid* (L^{\bullet}). Selanjutnya L^{\bullet} yang bereaksi dengan molekul O_2 dan membentuk *Radical Peroxyl Lipid* (LOO^{\bullet}). LOO^{\bullet} melalui reaksi siklisasi untuk membentuk endoperoksida, yang akhirnya membentuk MDA sebagai produk akhir dari proses Peroksidasi lipid. MDA juga dijadikan sebagai biomarker terjadinya *Stress*

Oksidatif akibat ketidak seimbangan antara oksidan dan antioksidan (Phaniendra et al., 2015; Tsikas, 2017).



Gambar 2. 6 Skema sederhana yang menggambarkan serangan Spesies Oksigen Reaktif (ROS)

Keterangan : ROS melalui peroksidasi PUFA menghasilkan Malondialdehyde (MDA) dan 4-hydroxy-2-nonenal (HNE). Asam arakidonat PUFA *eicosanoid* dioksidasi oleh ROS untuk membentuk isoprostan F₂ seperti 15 (S) -8-iso-prostaglandin F₂ yang lain selain MDA dan 4-hydroxy-2-nonenal (Tsikas, 2017).

Peroksidasi lipid erat kaitannya dengan berbagai penyakit pada otak dan CNS. Membran fosfolipid di CNS merupakan organel yang sangat diperkaya dengan PUFA. Hal ini lah yang mendasari CNS rentan terhadap Peroksidasi lipid.

Peroksidasi lipid juga dipercaya dapat menginduksi kematian sel neuron. Karena lipid bertanggung jawab untuk menjaga keutuhan membran sel, peroksidasi ekstensif lipid mengubah perakitan, komposisi, struktur, dan dinamika membran lipid sel neuron. Sebagai senyawa yang sangat reaktif, peroksida lipid juga dapat menyebarkan generasi ROS lebih lanjut, atau terdegradasi menjadi senyawa reaktif yang mampu mengikat silang DNA dan protein dan menginduksi apoptosis sel neuron (Gaschler & Stockwell, 2017).

MDA merupakan senyawa yang larut dalam air, metanol dan etanol, cukup larut dalam metilen klorida dan tidak larut dalam dietileter. MDA adalah senyawa

dikarbonil asam CH₃, asam aprotonat dalam larutan air: dengan nilai pK_a 4,46.

Tingkat keasaman MDA sama dengan asam karboksilat alifatik. Dengan fungsi karbonik yang dimilikinya, MDA menjadi reaktif secara kimiawi. MDA juga merupakan senyawa yang menyebabkan kerusakan dan mutasi DNA didalam sel. Mekanisme utama untuk perbaikan residu M1dG dalam DNA genom adalah jalur *Nucleotide Excision Repair* (NER). Namun jika tidak ada perbaikan, Kerusakan

DNA yang disebabkan MDA dapat menyebabkan mutasi (point and frameshift), untai putus, penangkapan siklus sel, dan induksi apoptosis pada sel (Ayala *et al.*, 2014).

2.5. Antioksidan

2.5.1. Pengertian Antioksidan

Antioksidan dipercaya dapat mengurangi faktor resiko dari penyakit seperti penyakit neurodegeneratif kronis seperti Alzheimer. Antioksidan bekerja dengan menetralkan radikal bebas yang menjadi penyebab kerusakan pada sel neuron. (Milisav *et al.*, 2018). Senyawa antioksidan dapat diartikan sebagai molekul endogen atau eksogen dalam keadaan konsentrasi yang rendah jika dibandingkan dengan substrat yang dapat teroksidasi secara signifikan atau menghambat oksidasi substrat. Antioksidan bekerja melawan oksidan melalui tiga cara, diantaranya mengisolasi ROS, meninaktivasi sumber ROS dan melakukan regenerasi antioksidan endogen (Cheignon *et al.*, 2018).

2.5.2. Klasifikasi Antioksidan

Dalam literatur yang membahas antioksidan Milisav *et al* (2018) dalam karya tulisnya menyatakan bahwa antioksidan dapat diklasifikasikan dalam dua kelompok, yaitu :

- a. Antioksidan enzimatis endogen atau sering disebut sebagai antioksidan primer. Salah satu contohnya adalah SOD (*Superoxide Dismutase*), beberapa peroksidase dan katalase. Jenis antioksidan ini bekerja dengan mengkatalisasi serangkaian reaksi yang mengubah ROS menjadi molekul yang lebih stabil, seperti H_2O dan O_2 . SOD juga dapat mengubah *Superoxide* menjadi *Hydrogen Perokside* sebagai substrat untuk katalase.
- b. Antioksidan nonenzimatis eksogen memiliki berat molekul kecil contohnya vitamin E dan C, dan mineral seperti selenium dan . Isoflavon. Didalam isoflavon terdapat senyawa utama seperti Genestein yang dapat bekerja mengikat ion logam transisi seperti Fe^{2+} dan Cu^{2+} yang terlibat dalam penghambat pembentukan ROS didalam neuron. Selain itu antioksidan nonenzimatis dapat menjaga kesehatan dengan mencegah atau menghambat pembentukan ROS. Hal ini sangat penting untuk menghindari terjadinya kerusakan sel.

2.6. Kacang Tunggak

2.7.1. Definisi Kacang Tunggak

Kacang Tunggak dengan nama latin *Vigna unguiculata*, merupakan salah satu tanaman utama yang dimanfaatkan untuk menjaga ketahanan pangan dan nutrisi di dunia. Tanaman ini memiliki kemampuan bertahan hidup di lingkungan yang panas dan kering. Sehingga mudah ditemukan dan di

budidayakan di daerah Asia dan Afrika. Kacang Tunggak termasuk dalam tanaman jenis diploid dengan jumlah kromosom $2n = 22$ (Lonardi *et al.*, 2019).

Tabel 2. 1 Nama *Vigna unguiculata* dalam berbagai bahasa

Bahasa	Nama
Arab	للوبياء
Bengali	Ghangra, Kulattha, Kalaya, Barbati
English	Cowpea, Black eye pea, Horse gram, Asparagus bean, Catjang, Catjang cowpea, Chinese long bean, Clay pea, Cream pea, Crowder pea, Pea bean, Purple-Hull pea, Southern pea, Sow pea, Yard-Long bean
French	Dolique asperge, Dolique mongette, Haricot asperge, Haricot indigène, Niébé, Pois à vache
Ghana	Adua, Ayi, Tipielega, Tuya, Saa
Gujrati	Kalathi, Kulathi
Hindi	Kulathi, Lobia, Kurathi
Indonesia	Kacang bol, Kacang merah, Kacang toonggak, Kacang béngkok
Kanada	Alasabde, Alasund, Huruli, Hurali
Malayalan	Kath
Marathi	Mudiraa
Nigeria	Wake, Ezo, Nyebbe, Ngalo, Azzo, Dijok, Alev, Arebe, Lubia, Mongo, Ewa, Akedi, Akoti
Punjambi	Lodhar
Sanskrits	Mahamasah, Rajamasah, Khalva, Vardhipatraka
Spanish	Costeño, Frijol de costa, Judía catjang, Judía espárrago, Rabiza
Swahili	Kunde

Keterangan : Sumber gambar Zaheer *et al* (2020)

Setidaknya ada 20 nama berupa sinonim ataupun nama umum yang sering digunakan untuk kelompok *Vigna unguiculata*. Berdasarkan morfologi maupun sifatnya Kacang Tunggak dibagi menjadi beberapa subspecies ataupun dalam beberapa *culti group*. Dalam masa tumbuhnya Kacang Tunggak dibagi menjadi dua fase, dimana pembagian fase tersebut mengacu pada pertumbuhan jumlah buku dan perkembangan bunga hingga menjadi polong masak. Yang pertama adalah fase vegetatif yang terjadi antara 40-49 hari, pada fase ini tanaman Kacang Tunggak belum menghasilkan bunga. Fase vegetatif pada Kacang Tunggak terjadi proses perkembangan mulai dari perkecambahan, penambahan jumlah daun, peningkatan tinggi tanaman yang diikuti dengan penambahan jumlah buku dan peningkatan berat tanaman Kacang Tunggak. Fase kedua adalah

Reproduktif, fase ini tergolong singkat, yakni hanya sekitar 35% dari seluruh umur hidup Kacang Tunggak. (Trustinah, 1998).

2.7.2. Taksonomi dan Morfologi Kacang Tunggak

Kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) merupakan salah satu tanaman yang termasuk dalam anggota dari genus *Vigna* dan juga termasuk ke dalam kelompok yang disebut *catjang*. Menurut Zaheer *et al.* (2020), Kacang tunggak juga dikenal dengan nama umum *cowpea*. Sementara di Indonesia, *Vigna unguiculata* (L.)

Walp dikenal dengan nama kacang tunggak atau kacang tolo. Tanaman ini termasuk salah satu anggota famili leguminosae dengan sistematika sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Divisio : Spermatophyta
 Subdivisio : Angiospermae
 Class : Dicotyledoneae
 Ordo : Polypetalae
 Famili : Leguminosae
 Subfamili : Papilionaceae
 Genus : *Vigna*
 Spesies : *V. unguiculata*
 Varietas : KT-1, KT-2, KT-3, KT-4, dsb.



Gambar 2. 7 Gambar Kacang Tunggak *Vigna unguiculata*

Keterangan : Gambar bersumber dari <http://www.litbang.pertanian.go.id>

Pertumbuhan Kacang Tunggak dapat dibedakan menjadi tipe determinit dan semideterminit dengan sifat pertumbuhan yang tegak, agak tegak ataupun menyebar dengan tinggi 30-140 cm. Tipe determinit merupakan tipe dengan ujung batang yang tidak melilit, masa pembungaannya singkat, bersamaan, dan pertumbuhannya berhenti setelah tanaman berbunga. Sedang tipe indeterminit ditandai dengan ujung batang yang melilit, proses pembungaan bertahap dari pangkal ke bagian pucuk. Pada batang utama Kacang Tunggak terdapat beberapa cabang yang biasanya muncul dari buku bagian bawah batang. Sementara setiap batanya terdiri dari beberapa buku, dimana tiap buku tersebut menghasilkan satu tangkai daun. Kemampuan Kacang Tunggak hidup di lingkungan kering, tidak lepas dari bentuk dengan bintil akar yang besar berbentuk bulat (Trustinah, 1998).

Daun Kacang Tunggak terdiri atas tiga helaian daun (trifoliolate) yang letaknya berseling. Daunnya berwarna hijau, berbentuk oval ataupun lanset dengan panjang daun berkisar antara 6,5-16 cm dan lebar daun 4-10 cm, dengan panjang tangkai daun antara 5-15 cm. Bunga Kacang Tunggak tersusun dalam bentuk tandan dengan ujung poros bunga yang muncul dari ketiak daun dengan 6-12 kuncup bunga dengan tangkai bunga yang pendek. Biji Kacang Tunggak bervariasi dengan berat 100 biji antara 10-25 g (Gambar 2.5). Panjang biji berkisar 2-12 mm dan memiliki hilum berwarna putih dengan cincin berwarna hitam (Zaheer *et al.*, 2020).

2.7.3. Kandungan Senyawa Kimia di dalam Kacang Tunggak

Kacang Tunggak merupakan tanaman yang dapat memenuhi nutrisi yang dibutuhkan tubuh. Kacang Tunggak mengandung protein tinggi dan kandungan lemak yang rendah. Dari seluruh kebutuhan protein tubuh dapat tersedia sekitar 5,0-37,0% dari total protein yang ada didalam kacang tunggak. Kacang Tunggak mengandung asam amino esensial seperti metionin, sistein, triptofan, treonin dan lisin. Selain itu kacang tunggak juga mengandung asam amino non esensial

dengan rasio masing-masing rata-rata 23,3, 35,6 dan 55,2%. Hal ini menunjukkan bahwa Kacang Tunggak berpotensi untuk memenuhi kebutuhan nutrisi manusia.

Selain itu didalam Kacang Tunggak juga ditemukan senyawa asam fitrat yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Asam sitrat berkerja sebagai agen hipokolesterolemik, dan sebagai penekan oksidasi yang disebabkan logam Fe. Hal ini menguntungkan jika digunakan sebagai solusi dalam usaha pencegahan beragam penyakit termasuk Alzheimer (Gonçalves *et al.*, 2016).

Selain yang dijelaskan diatas Kacang Tunggak juga memiliki nutrisi makro dan mikro nutrien yang dibutuhkan oleh tubuh. Kandungan kalori yang terdapat dalam Kacang Tunggak relatif sedikit, rata-rata, 8,0% dari asupan energi harian 2000 kkal. Data terbaru menunjukkan bahwa Kacang Tunggak memiliki kandungan lemak yang rendah jika dibandingkan dengan tumbuhan jenis kacang-kacangan lainnya. Sehingga konsumsi Kacang Tunggak dapat dianjurkan dalam diet pembatasan berat badan. Kandungan vitamin didalam Kacang Tunggak dapat berkerja sebagai antioksidan. Sementara kandungan mineral pada Kacang Tunggak dapat memenuhi asupan mineral harian yang direkomendasikan (Gonçalves *et al.*, 2016; Zaheer *et al.*, 2020).

Tabel 2. 2 Komposisi Mineral dan Vitamin

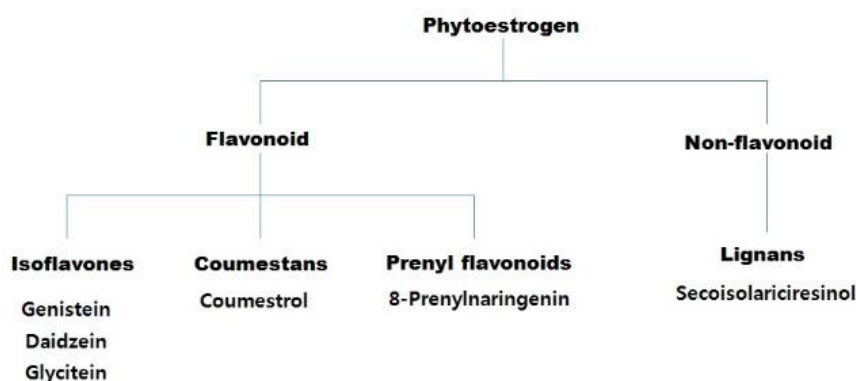
Komposisi Mineral mg/100g	
Calsium	126
Magnesium	51
Phosphorus	53
Potassium	431
Sodium	4
Iron	1.10
Zinc	1.01
Komposisi Vitamin mg/100g	
Ascorbid acid (C)	2.5
Thiamin (B1)	0.110
Riboflavin (B2)	0.145
Niacin (B3)	1.450
Pyridoxine (B6)	0.067
Vitamin A, IU	817 IU/100g

Keterangan : Menurut Zaheer *et al* (2020)

Kacang Tunggak memiliki kandungan senyawa fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa alami yang memiliki struktur kimia menyerupai struktur hormon estrogen dan memiliki aktivitas estrogenik yang berasal dari tumbuhan.

Kemiripan struktur ini ditunjukkan dengan adanya 2 cincin fenolik dalam isoflavon yang memungkinkan senyawa ini untuk berikatan dengan Estrogen Reseptor (ER)

Salah satu fitoestrogen yang paling banyak ditemukan dari jenis kacang adalah isoflavon. Genistein merupakan jenis isoflavon utama yang terdapat pada kacang tunggak (Kim & Park, 2012).



Gambar 2. 8 Klasifikasi *Phytoestrogen*

Keterangan : Dari bagan diatas dapat terlihat bahwa Genistein merupakan isoflavon merupakan Fitoestrogen dengan sifat Flavonoid (Kim & Park, 2012)

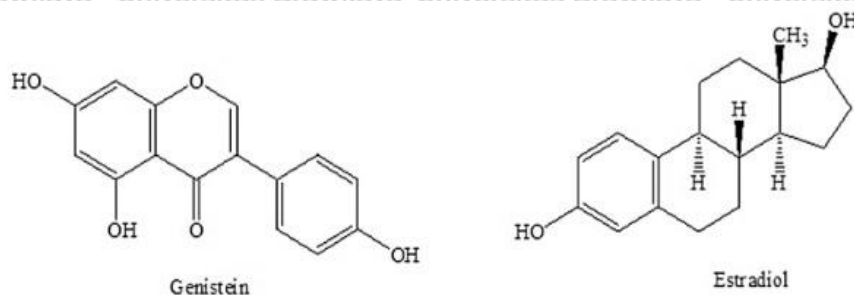
2.7. Genistein

2.7.1. Pengertian Genistein

Genistein (4', 5, 7-trihydroxyisoflavone) merupakan karakteristik flavonoid alami dari tanaman. Jenis isoflavon Genistein 50% lebih banyak jika dibandingkan dengan jenis isoflavon lainnya dan memiliki kemampuan sebagai senyawa pelindung neuron alami. Beberapa penelitian menyatakan bahwa Genistein memiliki banyak sifat fisiologis dan farmakologis yang dapat direkomendasikan sebagai pencegahan dan pengobatan sejumlah penyakit kronis seperti Alzheimer.

Karena aktifitas estrogenik yang dimilikinya, Genistein dianggap sebagai fitoestrogen. Genistein memiliki basis cincin fenolik dan jarak yang sama antara

gugus 4'- dan 7'- hidrosil dengan estradiol sebagai estrogen endogen. Kemiripan karakteristik ini memudahkan Genistein untuk mengikat protein pengikat hormon estrogen dan reseptor estrogen. Hal ini membuat Genistein dapat secara langsung menonaktifkan ROS dengan mengaktifkan ekspresi enzim antioksidan endogen (Devi *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2017).



Gambar 2. 9 Struktur kimia dari genistein dan Estradiol

Hasil studi yang dilakukan menunjukkan bahwa penggunaan Genistein dalam konsentrasi yang lebih rendah, tidak menyebabkan penghambatan yang tidak diinginkan dari enzim tirosin kinase, yang terjadi selama pengobatan dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genistein memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor ER β yang dapat dianggap sebagai terapi penggantian estrogen untuk potensi pengobatan Alzheimer. Evaluasi efikasi genistein (20 dan 200 nM) dalam sel neuron hipokampus mengungkapkan bahwa viabilitas sel dan promosi proliferasi oleh Genistein sebanding dengan 17β estradiol dalam sel, terutama dimediasi oleh jalur *Brain Derived Neurotrophic Factor/Tropomyosin Receptor Kinase* (BDNF/TrkB). BDNF neurotrofin yang diproduksi oleh neuron dapat mendukung dalam perkembangan neuron. Hal ini menjadikan Genistein dapat berperan dalam meningkatkan memori pasien Alzheimmer. (Devi *et al.*, 2017).

2.7.2. Farmakokinetik dan Farmakodinamik Kacang Tunggak

Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa Genistein memiliki kemampuan fisiologis dan farmakologis, untuk menjadi antioksidan. Hal ini membuta Genistein potensial untuk dijadikan sebagai pencegahan dan

pengobatan sejumlah penyakit kronis, termasuk penyakit Alzheimer. Genistein dalam bentuk murni ($C^{15}H^{10}O^5$) berbentuk bubuk putih yang tidak larut dalam air melainkan larut pada *Dimethyl Sulfoxide* dengan berat molekul 270.239 Da. Dengan pemberian 1 nM Genistein dapat menghasilkan efek perlindungan terhadap toksisitas yang diinduksi *Amyloid β* . Hal ini serupa dengan efek yang diinduksi oleh 2nM 17 β estradiol (Sureda *et al.*, 2017).

T_{max} Genistein terjadi pada 6-8 jam setelah mengkonsumsi makanan yang mengandung kedelai. Hal ini kemungkinan karena penyerapan di usus besar, karena daur ulang konjugat enterohepatik, atau keduanya Sementara dari makanan kedelai dengan kandungan isoflavon 50 mg/hari dari yang di konsumsi C_{max} yang dimiliki Genistein adalah 50-800 $\mu\text{g/mL}$. Metabolisme Genistein terjadi di usus dan hati dengan metabolit utama berupa Genistein glukuronida dan Genistein sulfat. Terapi dengan menggunakan Genistein (0,375 $\mu\text{g/mL}$) berdampak positif untuk sel neuron di hipokampus pada hewan coba tikus. Genistein secara signifikan melindungi neuron dengan meningkatkan sekresi- α dan melemahkan sekresi- β , melalui upregulasi jalur pensinyalan *Protein Kinase C* (PKC). Proses ini dapat mendukung pada penurunan pembentukan *Amyloid β* . (Devi *et al.*, 2017; Sureda *et al.*, 2017; Uddin & Kabir, 2019).

Hasil penelitian tentang parameter farmakokinetik Genistein yang dilakukan Hou *et al* (2008) dengan hewan coba tikus menunjukkan hasil bahwa Genistein yang diberikan secara oral diserap dengan cepat oleh tikus. Konsentrasi Genistein dalam plasma mencapai puncak pertamanya (C_{max1}) pada 10 menit dan puncak kedua (C_{max2}) terjadi pada 240 menit. Ini menunjukkan C_{max2} secara signifikan lebih rendah dari C_{max1} . Sementara dengan pemberian secara intravena tidak ditemukan C_{max2} . Dosis oral yang ditingkatkan dari 6,25 menjadi 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, C_{max} dan *Area Under The Curve* (AUC) meningkat searah dosis yang diberikan dosis dan tidak linier. Sifat Genistein yang mudah mengalami metabolisme menjadi

Genistein Glukuronidasi dan mudah terkonjugasi. Sejumlah besar genistein dapat terglukuronidasi di saluran cerna.

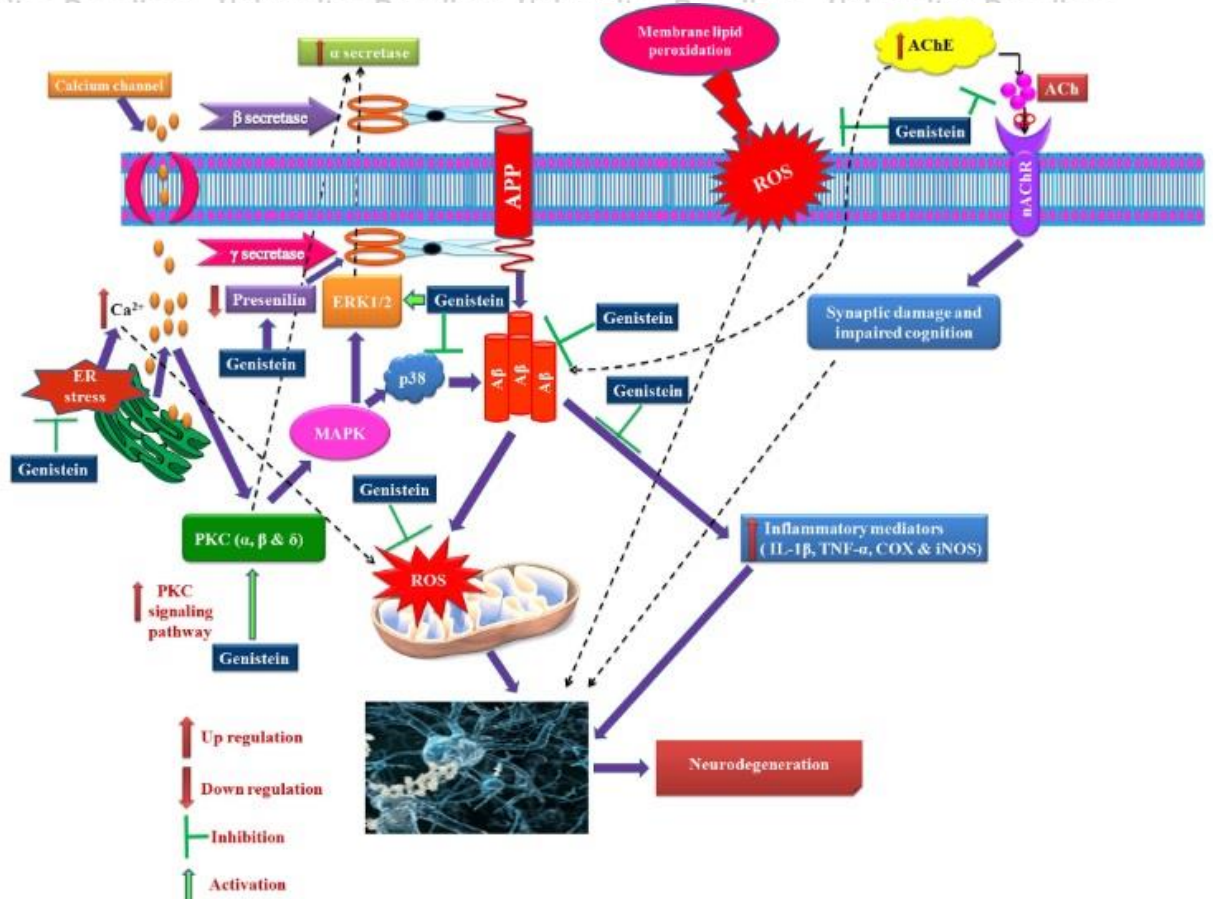
Hal ini mengakibatkan pemberian Genistein lebih sering secara oral dibandingkan dengan pemberian secara vena. Genistein didistribusikan ke seluruh tubuh tikus. Didalam jaringan, Genistein mencapai C_{max} dalam waktu 80 menit. Kemudian kadar Genistein yang didistribusikan di lambung, usus, hati, dan ginjal meningkat. Selanjutnya Genistein diekskresikan dalam empedu dan urin terutama dalam bentuk glukuronidasi genistein dalam urin tikus. Sementara genistein bebas dalam jumlah sedikit diekskresikan dalam urin.

2.7.3. Mekanisme Genistein dalam Mencegah Alzheimer

Alzheimer merupakan penyakit yang dapat menyebabkan demensia. Penyakit ini lebih banyak diderita oleh wanita. Hal ini dapat terjadi karena proses penuaan dan menopause yang dialami oleh wanita. Karena pada saat masa menopause, wanita mengalami penurunan hormon estrogen endogen secara drastis didalam tubuhnya. Pernyataan ini didukung dari hasil sebuah penelitian dengan hewan coba yang mengalami penurunan hormon estrogen terjadi penurunan metabolisme yang dapat menyebabkan penyakit Alzheimer (Hall, 2015; Tönnies & Trushina, 2017).

Alzheimer dapat terjadi akibat adanya penumpukan radikal bebas yang menginduksi peroksidasi lipid yang menghasilkan *Malondialdehyde* (MDA) dan plak *Amyloid β* di otak. Hormon estrogen yang dimiliki wanita memiliki kemampuan meningkatkan ekspresi enzim antioksidan endogen seperti MnSOD. Antioksidan ini sangat diperlukan oleh neuron untuk mengurangi ROS, sehingga mencegah terjadinya keadaan SO yang menyebabkan disfungsi sel neuron. Selain itu Zinc dan Copper yang menumpuk pada penderita Alzheimer dapat berinteraksi dengan *Amyloid β* dan menghasilkan ROS (Raz, 2014; Tönnies & Trushina, 2017).

Kacang Tunggak dengan tumbuhan yang memiliki kandungan jenis isoflavon utama Genistein. Genistein secara signifikan melindungi neuron dengan meningkatkan sekretase- α dan melemahkan sekretase- β , melalui upregulasi jalur pensinyalan *Protein Kinase C* (PKC). Proses ini dapat mendukung pada penurunan pembentukan *Amyloid β* dapat digunakan sebagai upaya pencegahan terhadap penyakit. Dengan struktur basis cincin fenolik dan jarak yang sama antara gugus 4- dan 7- hidroksil dengan 17 β -estradiol sebagai estrogen endogen, hal inilah yang dapat memudahkan Genistein untuk mengikat protein pengikat hormon estrogen dan reseptor estrogen. Genestein dapat mengaktifkan Nrf2/ARE (Nuclear factor (erythroid-derived 2) seperti elemen responsif antioksidan didalamsel untuk menghasilkan antioksidan endogen. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Genestein memiliki efek neuroprotektif di sinaptosom otak tikus dari toksisitas yang disebabkan oleh *Amyloid β* . Genistein berkerja dengan menekan toksisitas yang diinduksi oleh *Amyloid β* melalui kombinasi aktivitas pembersihan radikal bebas dan penghambatan pengendapan *Amyloid β* (Devi et al., 2017; Uddin & Kabir, 2019).



Gambar 2. 10 Mekanisme Geneistein dalam melindungi neuron

Keterangan : Genistein bekerja dengan mengaktifkan jalur pensinyalan Protein Kinase C (PKC) untuk peningkatan regulasi α -sekretase melalui *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) dan *Extracellular-Signal-Regulated Kinase* (ERK1 / 2). Genestein juga membantu mencegah *Amyloid β* menginduksi terjadinya neurotoksisitas (Devi *et al.*, 2017).

Genistein dapat melindungi sel neuron dengan mengaktifasi enzim protein kinase C (PKC, serin / treonin kinase yang bergantung pada fosfolipid). Enzim ini dapat merangsang pembelahan α -sekretase dari APP. Sebuah penelitian membuktikan pemberian Genistein (0,375 μ g/mL), dapat melindungi sel neuron dengan mengaktifkan enzim α -sekretase dan menurunkan β -sekretase, melalui peningkatan regulasi jalur pensinyalan PKC. sel saraf hipokampus tikus (Uddin & Kabir, 2019).

2.7. Tikus Putih

2.7.1. Taksonomi

Tikus (*Rattus*) adalah binatang percobaan yang umum dipakai dalam penelitian ilmiah. Hewan ini sudah diketahui sifatnya dan mudah dipelihara, serta relatif cocok untuk berbagai penelitian. Tikus berukuran lebih besar dan lebih cerdas daripada mencit. Tikus yang sering digunakan adalah tikus putih karena bersifat lebih tenang sehingga mudah dikerjakan beberapa intervensi, tidak terlalu takut terhadap cahaya, serta tidak begitu cenderung berkumpul sesama jenis.

Aktivitasnya tidak begitu terganggu oleh kehadiran manusia di sekitarnya. Berikut uraian klasifikasi sistem orde tikus (Rejeki PS, Putri EAC, 2012).

Kingdom	: <i>Animalia</i>
Filum	: <i>Chordate</i>
Kelas	: <i>Mamalia</i>
Ordo	: <i>Rodentia</i>
Famili	: <i>Murinae</i>
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus Norvegicus</i>

Tikus memiliki kesamaan dengan manusia dalam sistem reproduksi, sistem saraf, penyakit, dan kecemasannya. Hal ini terjadi karena adanya kesamaan organisasi DNA dan ekspresi gen di mana 98% gen manusia memiliki gen sebanding dengan gen tikus. Sedangkan konversi usia tikus dengan manusia dapat dihitung dengan memperhatikan rata-rata usia hidup tikus dan manusia. Tikus laboratorium dapat hidup hingga sekitar 2-3,5 tahun (rata-rata 3 tahun), sedangkan harapan hidup manusia di seluruh dunia adalah 80 tahun, dengan variasi sesuai dengan kondisi sosial ekonomi.

Menurut American Medical Association, usia rata-rata menopause pada wanita adalah 51 tahun ($51 \times 365 = 18615$ hari), dan tikus betina memasuki menopause antara usia 15 dan 20 bulan (600 hari). Jadi, $18615 \div 600 = 31,0$ hari manusia = 1 hari tikus, dan $365 \div 31 = 11,8$ hari tikus = 1 tahun manusia (Sengupta, 2013)

2.7.2. Tikus Model Ovariektomi

Ovariektomi adalah tindakan mengamputasi, mengeluarkan, dan menghilangkan ovarium dari rongga abdomen manusia atau binatang percobaan.

Ovariektomi (OVX) merupakan model menopause bedah, di mana kadar estrogen turun lebih cepat dibandingkan dengan penurunan yang terjadi pada menopause alami. OVX dikaitkan dengan peningkatan *remodelling* tulang dan pengurangan BMD, volume, dan kekuatan pada berbagai spesies, termasuk tikus dan monyet cynomolgus (Rejeki PS, Putri EAC, 2012).

Prosedur kerja untuk operasi ovariektomi mengacu pada SOP (*Standar Operational Procedure*) yang telah ditetapkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Berikut beberapa teknik yang bisa dilakukan untuk pelaksanaan ovariektomi (Rejeki PS, Putri EAC, 2012).

a. Teknik ovariektomi *Double Dorsolateral Incision* dilakukan dengan insisi pada garis tengah area dorsolateral kanan, kemudian dilakukan pembedahan pada sisi kanan dorsolateral, pengambilan ovarium kanan hingga penutupan luka. Selanjutnya dilakukan insisi yang kedua di area dorsolateral kiri untuk mengambil ovarium kiri dengan prosedur yang sama.

Teknik ini cenderung menyebabkan perdarahan sehingga membutuhkan jahitan yang lebih banyak hingga penutupan luka. Selanjutnya dilakukan insisi yang kedua di area dorsolateral kiri untuk mengambil ovarium kiri dengan prosedur yang sama. Teknik ini cenderung menyebabkan

perdarahan sehingga membutuhkan jahitan yang lebih banyak.

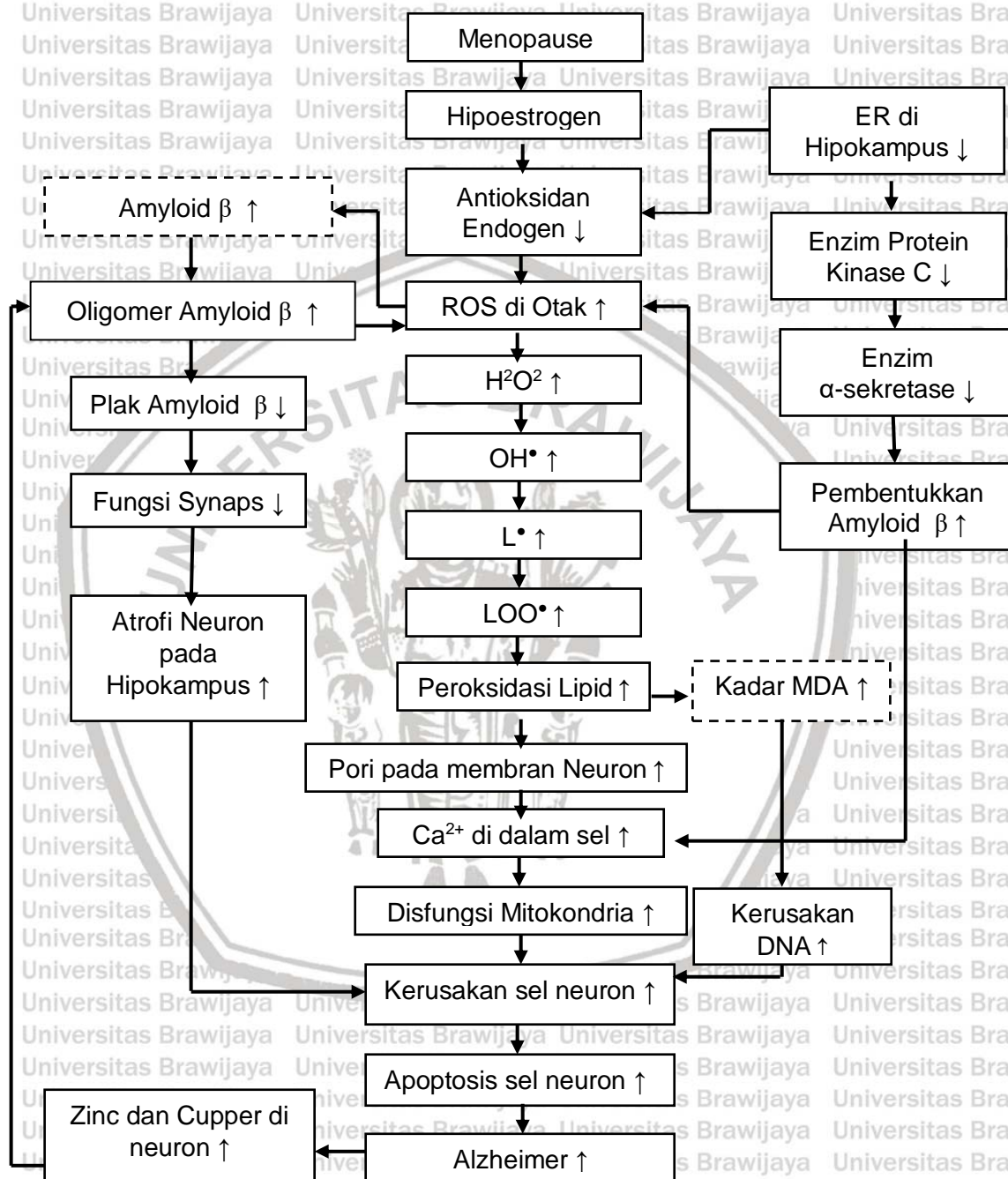
b. Teknik ovariektomi *Single Midline Dorsal incision* dilakukan dengan insisi pada garis tengah, pada area mid dorsum, pembedahan dan pengambilan kedua ovarium sekaligus dengan hanya satu insisi.

Teknik ovariektomi *Ventral incision/abdominal transverse incision* dilakukan dengan insisi kecil peritoneal secara transversal pada bagian tengah abdomen dan sedikit ke kanan sehingga otot abdominal transversum terekspos. Setelah diseksi otot, barulah rongga peritoneum dan jaringan adiposa yang meliputi ovarium terlihat. Pengambilan ovarium dilakukan sekaligus dengan satu insisi di ventral abdomen, ovarium kanan dan kiri diambil kemudian dilakukan penutupan luka.



BAB 3 KERANGKA TEORI DAN KONSEP PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori



Gambar 3. 1 Kerangka Teori

Keterangan : ↑ / ↓ : Meningkatkan / Menurunkan □ : Tidak diteliti
 → : Mempengaruhi - - - □ : Diteliti

Keterangan :

Menopause yang terjadi pada wanita dapat terjadi secara alami karena proses penuaan ataupun secara buatan seperti ovariectomi. Pada masa ini folikel pada ovarium tidak lagi diproduksi secara permanen. Akibatnya hormon Estrogen yang ada di dalam tubuh menjadi menurun secara signifikan. Hal ini dapat menimbulkan efek jangka pendek seperti hot flushes, insomnia dan efek jangka panjang seperti gangguan kognitif hingga terjadinya Alzheimer (Raz, 2014).

Kekurangan hormon estrogen yang terjadi pada masa menopause juga mengakibatkan Estrogen Reseptor di Otak menurun. Hal ini mempengaruhi persinyalan *Protein Kinase C* (PKC) yang dapat meningkatkan α -secretase dalam menghalangi produksi *Amyloid β* menjadi terganggu. Akibatnya terjadi pembentukan *Amyloid β* di otak. Penumpukan ini akan menjadi plak *Amyloid β* dan dapat meningkatkan kerusakan pada neuron akibat kegagalan synaps menjalankan fungsinya dan meningkatkan ROS pada sel neuron (Devi *et al.*, 2017; Cheignon *et al.*, 2018).

Estrogen merupakan hormon secara fisiologis dapat meningkatkan enzim antioksidan secara alami di dalam neuron dengan mempromosikan protein *Mangan Superoksida Dismutase* (MnSOD). Otak merupakan organ yang memiliki 3 sampai 5 kali lebih banyak mitokondria dibandingkan organ lainnya. Memungkinkan peningkatan ROS di otak secara berlebihan. Peran antioksidan untuk mengurangi ROS sangat dibutuhkan otak. Berkurangnya hormon estrogen menyebabkan ketidak seimbangan antara ROS dan antioksidan. ROS dapat meningkatkan terjadinya kerusakan sel dan toksisitas *Amyloid β* (Hall, 2015).

Superoksida ($O_2^{\bullet-}$) merupakan jenis ROS yang paling sering ditemukan. Peningkatan $O_2^{\bullet-}$ juga mengakibatkan peningkatan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) secara berlebihan. H_2O_2 yang bereaksi dengan Fe^{2+} atau Cu^{2+} pada neuron dapat mengakibatkan terbentuknya Hidroksil (OH^{\bullet}) yang sangat reaktif terhadap lipid.

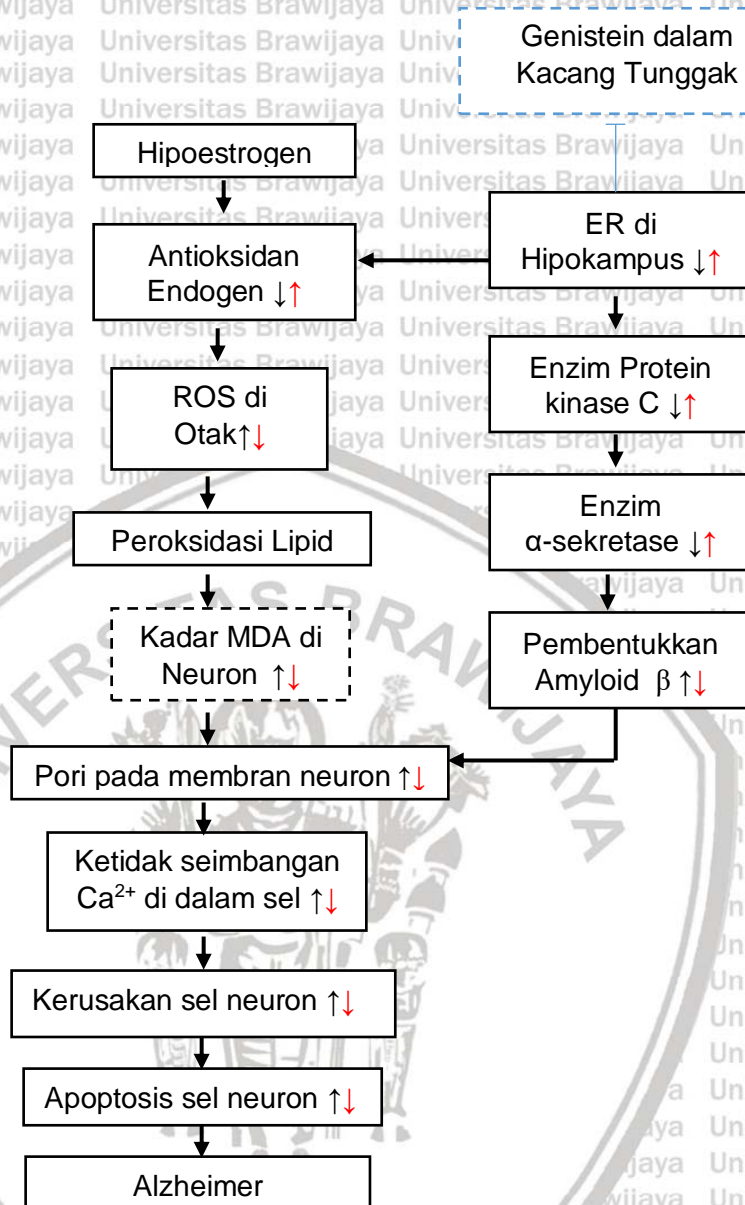
OH[•] dapat menyerang Hidrogen dari *Fatty Acid* dan menghasilkan *Radical Lipid* (L[•]). Selanjutya L[•] yang bereaksi dengan molekul O² dan membentuk LOO[•]. LOO[•] melalui reaksi siklisasi untuk membentuk endoperoksida, yang akhirnya menyebabkan proses Peroksidasi lipid dengan hasil akhir terbentuknya *Malondialdehyde* (MDA). MDA juga merupakan senyawa yang menyebabkan kerusakan dan mutasi DNA didalam sel (Phaniendra *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2016).

Membran lipid memiliki fungsi penting dalam mengontrol keadaan fisiologis organ membran dengan memodifikasi aspek biofisiknya, seperti polaritas dan permeabilitasnya akibat pembentukan pori pada membran. Pori pada membran dapat terbentuk hilang atau rusaknya molekul lipid sehingga membentuk pori. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan pada sel neuron akibat terganggunya homeostatis ion Kalsium (Ca²⁺) pada sel dan mengakibatkan kerusakan neuron yang mengarah pada apoptosis sel neuron (Devi *et al.*, 2017; Reiss *et al.*, 2018).

Amyloid β diyakini sebagai penyebab terjadinya gangguan fungsi sinaptik, atrofi neuron hipokampus dan korteks serebral, demensia dan gangguan kognitif pada penyakit Alzheimer. Pengendapan *Amyloid β* di otak pada bagian hipokampus, berbahaya bagi sel neuron. *Amyloid β* merupakan peptide residu yang di bentuk oleh APP (*Amyloid Precursor Protein*. APP sendiri merupakan protein transmembran tipe 1 yang di ekspresikan oleh berbagai jaringan terutama *Central Nervous System* (CNS) (Chuang *et al.*, 2018; Reiss *et al.*, 2018).

Dalam keadaan normal *Zinc* dan *Cupper* diperlukan otak mengatur aktivitas synaps dalam menjalankan fungsinya untuk menghataarkan sinyal. Pada Alzheimer peningkatan *Zinc* dan *Cupper* meningkat menghasilkan ROS dan menimbulkan kerusakan sel dengan meningkatnya MDA dan toksisitas *Amyloid β* (Cheignon *et al.*, 2018).

3.2 Kerangka Konsep



Gambar 3. 2 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan : ↑ / ↓ : Meningkatkan / Menurunkan
 → : Mempengaruhi
 ⊥ : Menghambat
 □ : Tidak diteliti
 □ (dashed) : Diteliti

Keterangan:

Kacang Tunggak memiliki kandungan senyawa fitoestrogen. Fitoestrogen merupakan senyawa alami yang memiliki struktur kimia menyerupai struktur hormon estrogen dan memiliki aktivitas estrogenik yang berasal dari tumbuhan.

Kemiripan struktur ini ditunjukkan dengan adanya 2 cincin fenolik dalam isoflavon yang memungkinkan senyawa ini untuk berikatan dengan Estrogen Reseptor (ER)

Salah satu fitoestrogen yang paling banyak ditemukan dari jenis kacang adalah isoflavon. Genistein merupakan jenis isoflavon utama yang terdapat pada kacang tunggak.

Genistein memiliki basis cincin fenolik dan jarak yang sama antara gugus 4'- dan 7'- hidroksil dengan estradiol sebagai estrogen endogen. Kemiripan karakteristik ini memudahkan Genistein untuk mengikat protein pengikat hormon estrogen dan reseptor estrogen. Hal ini membuat Genistein dapat secara langsung menonaktifkan ROS dengan mengaktifkan ekspresi enzim antioksidan endogen. Hasil studi yang dilakukan menunjukkan bahwa penggunaan Genistein dalam konsentrasi yang lebih rendah, tidak menyebabkan penghambatan yang tidak diinginkan dari enzim tirosin kinase, yang terjadi selama pengobatan dengan konsentrasi genistein yang tinggi. Genistein memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor ER β yang dapat dianggap sebagai terapi penggantian estrogen untuk potensi pengobatan Alzheimer.

Genistein dapat melindungi sel neuron dengan mengaktifasi enzim protein kinase C (PKC, serin / treonin kinase yang bergantung pada fosfolipid). Enzim ini dapat merangsang pembelahan α -sekretase dari APP. Sebuah penelitian membuktikan pemberian Genistein (0,375 μ g/mL), dapat melindungi sel neuron dengan mengaktifkan enzim α -sekretase dan menurunkan β -sekretase.

3.3 Hipotesis

3.2.1. Hipotesis Umum

Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan Kadar *Malondialdehyde* dan Ekspresi *Amyloid β* pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi.

3.2.2. Hipotesis Khusus

- a. Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan Kadar *Malondialdehyde* pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi.
- b. Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dapat menurunkan Ekspresi *Amyloid β* pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental* dengan pendekatan *post test only control grup design*. Metode penelitian ini adalah penelitian eksperimen (*true experiment*), diartikan sebagai metode yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali. Dalam hal ini penulis menggunakan kelas kontrol sebagai pembanding maka penelitian ini juga bisa disebut eksperimen murni. Metode ini digunakan atas dasar pertimbangan bahwa sifat penelitian eksperimental yaitu mencoba sesuatu untuk mengetahui atau akibat dari suatu perlakuan. Sedangkan pendekatan *post test only control grup design* yaitu fenomena yang terjadi akibat adanya intervensi yang diamati setelah intervensi tersebut diberikan.

Peneliti mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan membandingkan kelompok kontrol, tanpa terlebih dahulu melakukan *pretest* (Zainuddin, 2011). Perlakuan/intervensi yang diberikan dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dengan berbagai dosis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). Akibat dari perlakuan/intervensi yang diamati adalah Kadar MDA dan Ekspresi Amyloid β pada otak tikus putih.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi

Populasi dari penelitian ini adalah tikus putih *Rattus norvegicus* galur

Sprague-Dawley betina berusia 15 bulan dengan berat 200-350 gram yang telah di ovariektomi.

4.2.2. Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari populasi penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Jenis kelamin betina
- Berusia 15 bulan
- Telah diovariektomi
- Memiliki berat badan 200-350 gram
- Tikus sehat (aktif, bulu putih bersih, mata cerah dan tidak cacat)

4.2.3. Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari populasi penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Tikus bunting
- Tikus yang sudah pernah dipakai percobaan

4.2.4. Kriteria Drop Out

Kriteria *drop out* dari populasi penelitian ini yaitu tikus yang mati sebelum penelitian selesai

4.2.5. Sampel dan Besar Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang memenuhi kriteria inklusi. Besar sampel penelitian yang digunakan ditentukan dengan menggunakan rumus Federer :

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

Dengan (t) adalah jumlah kelompok perlakuan dan (n) adalah jumlah ulangan pada masing-masing kelompok. Perhitungan jumlah sampel untuk setiap kelompok adalah sebagai berikut.

Penelitian ini akan dibagi menjadi 6 kelompok sehingga perhitungannya adalah :

$$(6-1) \times (n-1) \geq 15 = 5(n-1) \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

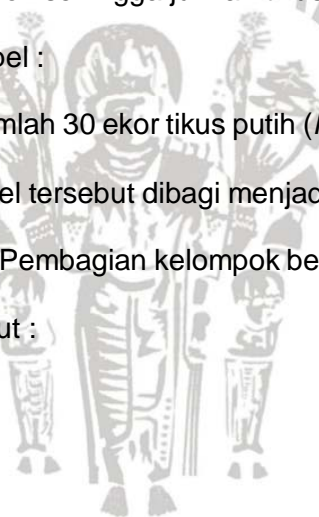
$$n \geq 4$$

Jumlah sampel keseluruhan adalah jumlah kelompok pengamatan dikalikan dengan jumlah pengulangan. Peneliti menggunakan 4 sampel pada masing-masing 4 kelompok perlakuan dan 2 kelompok kontrol sehingga perhitungannya adalah $(4+2) \times 4 = 24$ ekor tikus. Namun untuk menghindari adanya penurunan

besaran sampel akibat sakit dan kematian, maka replikasi di perbanyak menjadi 5 ekor tikus per kelompok sehingga jumlah tikus keseluruhan menjadi 30 ekor.

Cara persiapan sampel :

Sampel berjumlah 30 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina yang telah di ovariectomi. Sampel tersebut dibagi menjadi 6 kelompok dengan 5 ekor tikus di setiap kelompoknya. Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut :



Tabel 4. 1 Pembagian kelompok berdasarkan perlakuan

Kelompok kontrol negatif	tikus yang tidak diovariectomi, dipertahankan selama 1 bulan dan diberi aquadest
Kelompok kontrol positif	tikus yang diovariectomi, dipertahankan selama 40 hari dan diberi aquadest
Kelompok Estradiol	tikus yang diovariectomi, dipertahankan selama 40 hari dan diberi terapi hormon estradiol dengan dosis 0,18 mg/kgBB
Kelompok Dosis 1	tikus yang diovariectomi, dipertahankan selama 40 hari dan diberi ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 1 (1,25 mg/kgBB/hr per oral dengan menggunakan sonde lambung.
Kelompok Dosis 2	tikus yang diovariectomi, dipertahankan selama 40 hari dan diberi ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 2 (2,5 mg/kgBB/hr) peroral dengan menggunakan sonde lambung
Kelompok Dosis 3	tikus yang diovariectomi, dipertahankan selama 40 hari dan diberi ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 3 (5 mg/kgBB/hr) peroral dengan menggunakan sonde lambung

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

4.3.1. Tempat Penelitian

Tabel 4. 2 Tempat Penelitian

Tempat	Kegiatan
Lab. Farmakologi FKUB	Pembuatan ekstrak kacang tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>)
Lab. Farmakologi FKUB	Pemeliharaan hewan coba (adaptasi, Ovariektomi, perlakuan dan terminasi
Lab. Patologi Anatomi (PA) FKUB	Pembuatan preparat penelitian,
Lab. Biokimia FKUB	Pembuatan supernatan dan Pemeriksaan kadar MDA
Lab. Biomedik FKUB	Pemeriksaan Ekspresi <i>Amyloid</i> β

4.3.2. Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 3 bulan terhitung mulai Januari 2021.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas (Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dalam dosis 1,25 mg/kgBB/hari; 2,5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari.

4.4.2. Variabel Terikat (Dependen)

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar MDA dan ekspresi *Amyloid* β pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*).

4.5 Defenisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Cara Ukur	Skala
Ekstrak kacang tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>)	Kacang tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>) dalam bentuk bubuk (<i>powder</i>) dari Balikabi Kota Malang, di ekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut ethanol. Sebanyak 500 gr serbuk Kacang Tunggak dapat menghasilkan 77 gr ekstrak pasta. Ekstrak Kacang Tunggak diberikan dengan dosis 1,25 mg/KgBB/hr, 2,5 mg/KgBB/hr dan 5 mg/KgBB/hr	Dosis 1 : 1,25 mg/kgBB/hr Dosis 2: 2,5 mg/kgBB/hr Dosis 3 : 5 mg/kgBB/hr	Rasio
Kada MDA pada Otak	Kadar <i>malondialdehyde</i> pada otak kiri tikus saat setelah diterminasi yang diukur menggunakan <i>Elabscience MDA ELISA Kit Catalog No. E-EL-0060</i> , yang dilakukan setelah 40 hari pemberian ekstrak kacang tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>)	nmol/mL	Rasio
Ekspresi <i>Amyloid β</i> pada otak	Penampilan distribusi visual warna hijau dari <i>Amyloid β</i> otak kanan menggunakan metode <i>Immunofluorescence assay</i> (IFA) setelah 40 hari pemeberian ekstrak Kacang Tunggak, dengan pemberian marker antibodi beta <i>Amyloid bsm-0107M</i> dari <i>biossusaantibodies</i> kemudian diamatai menggunakan mikroskop <i>Immunofluorescence</i> . Dihitung melalui pengamatan 5 kali lapang pandang menggunakan mikroskop dengan pembesaran 400x.	Persentase	Rasio

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1. Pembuatan Ekstrak Kacang Tunggak

- a. Kacang tunggak (*Vigna Unguiculata*) didapatkan dari Balitkabi Kota Malang dalam kondisi kemasan dan kering.
- b. Kacang tunggak kering dihaluskan dengan blender.
- c. Pembuatan ekstrak kacang tunggak dengan cara maserasi yaitu kacang tunggak yang telah halus ditimbang kemudian direndam dengan pelarut ethanol sampai volume 1000 mL.
- d. Kacang tunggak yang telah direndam dikocok pada *shaker* selama ± 30 menit dan didiamkan semalaman (24 jam) sampai terbentuk endapan.
- e. Cairan bagian atas yang merupakan ethanol (pelarut) dan zat aktif yang sudah tercampur diambil dan disaring menggunakan kertas saring.
- f. Proses perendaman dilakukan sebanyak tiga kali
- g. Cairan lapisan atas diambil dan dimasukkan ke dalam labu evaporasi 1 L untuk dilakukan proses evaporasi.
- h. Memasang labu pada alat evaporator dan mengisi *water bath* dengan air sampai penuh.
- i. Memasang rangkaian alat (*rotator evaporator*, pemanas *water bath* yang kemudian disambungkan dengan aliran listrik.
- j. Larutan ethanol dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada di dalam labu evaporasi.
- k. Aliran ethanol ditunggu sampai berhenti menetes pada labu penampungan ($\pm 1,5$ hingga 2 jam pada tiap labu).
- l. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam cawan penguap kemudian dimasukkan ke dalam oven pada suhu titik didih ethanol yaitu 72°C .
- m. Hasil ekstraksi di oven sampai berat tetap (penimbangan dilakukan sebanyak tiga kali dan hasil pengukurannya tetap). Hasil ekstraksi yang

didapatkan adalah $\pm \frac{1}{5} - \frac{1}{10}$ dari bahan alam kering.

n. Hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam botol kaca disimpan di freezer.

4.6.2. Prosedur Pemilihan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur Sprague-Dawley dipilih dengan berat sekitar 200-350 gram dan berusia 15 bulan. Tikus betina diaklimatisasi selama 1 minggu dan dilakukan ovariectomi. Tikus diistirahatkan selama 1 bulan kemudian diberikan perlakuan sesuai dosis yang ditetapkan.

4.6.3. Prosedur Pemeliharaan Hewan Coba

Pemeliharaan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya Malang. Hewan coba diadaptasikan (aklimatisasi) dengan kondisi suhu lingkungan yang stabil dan baik selama 7 hari agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya. Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina dewasa galur Sprague-Dawley umur 15 bulan dengan berat 200-300 gram dan sehat. Hewan coba dimasukkan ke dalam kandang yang terbuat dari bahan dasar plastik dengan ukuran 20 cm x 30 cm x 40 cm yang dialasi dengan sekam setebal 0,5-1 cm pada dasar kandang dan diganti dua kali seminggu untuk mencegah infeksi yang dapat terjadi akibat kotoran tikus tersebut. Kandang ditutup dengan kawat berjaring agar tikus tidak mudah keluar.

Setiap kandang berisi 2-3 ekor dan berat badan hewan coba ditimbang setiap 10 hari sekali. Cahaya ruangan dikontrol 12 jam terang dan 12 jam gelap, sedangkan temperatur dan kelembapan ruangan dibiarkan berada pada kisaran suhu 27-28°C. Hewan coba diberi makan dengan pakan standar yang digunakan yaitu Poor Standar 511 kering (40 gram/ekor), dan minum yang diletakkan di dalam botol khusus yang diberikan secara *ad libitum*. Setiap tikus diberi perlakuan sesuai dengan ketentuan yang sudah ditetapkan.

4.6.4. Prosedur Ovariektomi

Ovariektomi dilakukan oleh petugas Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya. Ovariektomi bertujuan untuk membuat tikus menjadi hipoestrogen sehingga didapatkan tikus model Alzheimer yang diinduksi oleh ovariektomi. Menurut Rejeki *et al* (2019) tindakan ovariektomi dilakukan melalui beberapa tahap sebagai berikut :

- a. Alat yang digunakan berupa satu set alat bedah, spuit 1 cc, meja operasi kecil, baki plastik, sarung tangan, duk steril, bengkok, dan kandang pemulihan.
- b. Bahan yang gunakan berupa anastesi (kombinasi ketamine dosis 80mg/kgBB dan xylazine 10mg/kgBB), ethanol, povidin iodine, Benang *cut gut* (chromic 3/0 dan silk 3/0), kassa steril, dan plester.
- c. Prosedur Standar tindakan ovariektomi dilakukan dengan menimbang tikus untuk menentukan dosis anastesi yang diperlukan. Pemberian anastesi dilakukan secara intraperitoneal. Lapang operasi pada abdomen tikus disiapkan dengan mencukur rambut pada abdomen kemudian oleskan ethanol. Selanjutnya memuat insisi kecil tegak lurus peritoneal (transverse peritoneal) sepanjang 0,4-0,6 cm dengan pisau scalpel ukuran 11 di pertengahan abdomen dan secara ringan arahkan ke sisi kanan, mendekati puting susu kedua kanan. Setelah mencapai kavum peritoneal, jaringan adiposa ditarik sampai tuba uterine kanan dan ovarium teridentifikasi. Lakukan juga untuk tuba dan ovarium kiri. Letakkan masing-masing organ diatas duk steril. Lakukan pengikatan pada daerah distal tuba uterin dan potong ovarium begitun pada ovarium sisi sebaliknya. Kemudian memasukkan kembali tuba ke dalam kavum peritoneal. Lalu jahit kembali ke dalam 2 lapisan (otot dan kulit) dengan catgut. Untuk peritoneum dan otot menggunakan benang yang mudah di absorpsi (chromic sutures 3/0),

sedangkan untuk kulit menggunakan benang non absorbs (silk sutures 3/0).

Tindakan di akhiri dengan mengolesi bekas jahitan dengan povidone iodine untuk selanjutnya dilakukan perawatan dengan teknik aseptik pada tikus post ovariektomi.

4.6.5. Pemeriksaan kondisi hipoestrogen

Hari ke-28 pasca ovariektomi dilakukan swab vagina pada hewan coba untuk melihat kondisi pH vagina. Apabila pH vagina lebih dari 7,3 maka dinyatakan dalam kondisi basa, keadaan tersebut menunjukkan hewan coba dalam kondisi hipoestrogen.

Pengukuran pH vagina hewan coba dilakukan menggunakan pH indikator strips MERCK dengan cara sebagai berikut:

- Hewan coba dipegang dengan posisi terlentang.
- Vagina hewan coba dibuka.
- Pengambilan sekret mukosa vagina pada introitus vagina dan kanalis vaginalis hewan coba menggunakan cotton swab dengan 3 kali putaran searah jarum jam.
- Hasil swab dioleskan pada pH indikator strips MERCK selama 1 sampai 3 detik, maksimal 10 menit.
- Pembacaan hasil pemeriksaan pH indikator strips sesuai dengan standar pH indikator strips MERCK (pH 0-14).

4.6.6. Pemberian dosis ekstrak kacang tunggak

Ekstrak kacang tunggak diberikan pada 1 bulan setelah ovariektomi. Dosis pemberian ekstrak kacang tunggak merujuk pada jurnal Khusniyati et al (2014) yaitu dosis 1,25 mg/kgBB; 2,5 mg/kgBB; dan 5,0 mg/kgBB, diberikan 1x setiap hari. ekstrak kacang tunggak diberikan selama 40 hari pasca ovariektomi secara per oral melalui sonde. Ekstrak dilarutkan dengan aquabidest dan penimbangan

berat badan tikus dilakukan setiap 10 hari untuk menghitung dosis yang akan diberikan. Perhitungan dosis tersebut adalah sebagai berikut :

BB tikus x dosis

1000

Sebagai contoh missal BB tikus 250 gram, maka :

1) Dosis 1

$$\frac{260 \text{ gram} \times 1,25 \text{ mg}}{1000} = 0,325 \text{ mg}$$

2) Dosis 2

$$\frac{260 \text{ gram} \times 2,5 \text{ mg}}{1000} = 0,65 \text{ mg}$$

3) Dosis 3

$$\frac{260 \text{ gram} \times 5 \text{ mg}}{1000} = 1,3 \text{ mg}$$

Membuat larutan ekstrak kacang tunggak 5 mg/ml dengan menimbang 2,5 gram ekstrak kacang tunggak dan dilarutkan dalam 500 ml aquabidest dan larutan konsentrasi sesuai kebutuhan. Semisal tikus dengan BB 250 gram yaitu 0,31 mg/ml (dosis I); 0,625 mg/ml (dosis II); dan 1,25 mg/ml (dosis III).

a. Untuk membuat larutan dosis 1 = konsentrasi 0,31 mg/ml. Mengambil 6,2 ml larutan stok dan ditambah 93,8 ml aquabidest. Diberikan pada tikus dosis I (1 ml/tikus/hari).

b. Untuk membuat larutan dosis 2 = konsentrasi 0,625 mg/ml. Mengambil 12,5 ml larutan stok dan ditambah 87,5 ml aquabidest. Diberikan pada tikus dosis 2 (1 ml/tikus/hari).

c. Untuk membuat larutan dosis 3 = konsentrasi 1,25 mg/ml. Mengambil 25 ml larutan stok dan ditambah 75 ml aquabidest. Diberikan pada tikus dosis III (1 ml/tikus/hari).

4.6.7. Terminasi dan Pengambilan Organ

Tindakan terminasi dilakukan dengan memberikan injeksi agen anastesi (ketamin) dengan tujuan mengambil bagian otak sebagai sampel.

4.6.8. Prosedur Pemotongan Organ

Otak dipisahkan menjadi dua bagian kiri dan kanan. Bagian kiri akan disimpan pada *freezer* sebelum dilakukan pemeriksaan kadar MDA. Sedangkan bagian otak kanan disimpan dalam wadah tertutup dengan 10% buffer formalin dan berkode untuk selanjutnya dipersiapkan menjadi preparat untuk diperiksa ekspresi *Amyloid β* .

Pemotongan jaringan otak kanan untuk diamati ekspresi *Amyloid β* dilakukan dengan:

- Jaringan dikeluarkan dari mesin *Automatic Tissue Tex* Prosesor.
- Dilakukan blok paraffin.
- Jaringan dipotong dengan alat Microtome ketebalan 3-5 mikron
- Diletakkan dalam oven selama 30 menit dengan suhu 70-80°C, kemudian dimasukkan ke dalam 2 tabung larutan xylol masing-masing 20 menit, setelah itu dimasukkan ke 4 tabung alkohol selama 3 menit pada masing-masing tempat (untuk hidrasi).

4.6.9. Pengukuran Kadar MDA Otak

Pengukuran MDA Otak dilakukan menggunakan prinsip ELISA- *Sandwich*. Plat ELISA mikro yang digunakan telah dilapisi dengan antibodi khusus untuk MDA. Standar atau sampel ditambahkan ke *plate well* ELISA mikro dan dikombinasikan dengan antibodi spesifik. Kemudian antibodi pendeteksi terbiotinilasi khusus untuk MDA dan konjugat Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ditambahkan secara berturut-turut ke setiap pelat mikro dengan baik dan diinkubasi. Komponen yang bebas dicuci lalu larutan substrat ditambahkan ke masing-masing *well*. Pada *well* yang mengandung MDA, deteksi antibodi biotinilasi dan konjugat Avidin HRP akan tampak berwarna biru. Reaksi enzim-substrat diakhiri dengan penambahan larutan *stop* dan warnanya menjadi kuning. *Optical density* (OD) diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 450 nm \pm 2

nm. Nilai OD sebanding dengan konsentrasi MDA. Pengukuran konsentrasi MDA dalam sampel dapat dilakukan dengan membandingkan OD sampel dengan kurva standar. Adapun tahapan pengukuran MDA terdiri dari beberapa hal sebagai berikut:

a. Persiapan Sampel

Otak kiri yang beku di letakkan pada suhu ruangan. Lakukan pemotongan setiap bagian otak kiri dan di timbang dengan berat 0.1 - 0,5 g. Letakkan pada cawan dan tambahkan aquades dengan perbandingan 1:10. Gerus hingga padatan otak hancur lalu letakkan pada tabung *Centrifuge* yang sudah disiapkan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi selama 10 menit pada 800×g pada 2-8 °C.

b. Persiapan reagen

- 1) Semua reagen dibawa ke suhu kamar (18-25 °C) sebelum digunakan. *Set-up microplate* dan panaskan terlebih dahulu selama 15 menit
- 2) *Wash Buffer* : 30 mL *Concentrated Wash Buffer* diencerkan dengan 720 mL air deionisasi atau suling untuk menyiapkan 750 mL *Wash Buffer*. Jika kristal telah terbentuk, konsentrat dihangatkan terlebih dahulu dalam penangas air 40 °C dan diaduk perlahan sampai kristal benar-benar larut.
- 3) *Standard working solution* : Standar disentrifus pada 10.000×g selama 1 menit. Ditambahkan 1,0 mL standar referensi & pengencer sampel, kemudian didiamkan selama 10 menit dan dibalik perlahan beberapa kali. Setelah larut sepenuhnya, larutan diaduk rata dengan pipet. Pemulihan ini menghasilkan *working solution* 2000 ng/mL. Setelah itu, pengenceran dibuat serial sesuai dengan kebutuhan. Gradien pengenceran yang disarankan adalah sebagai berikut : 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 0 ng/mL. Adapun metode pengenceran dilakukan dengan cara :

– Menyiapkan 7 tabung EP kemudian ditambahkan 500 uL Standar

Referensi & Pengencer Sampel ke setiap tabung.

- Mengambil 500 μL *working solution* 2000 ng/mL ke tabung pertama dan dicampur hingga menghasilkan larutan kerja 1000 ng/mL.
- Mengambil 500 μL larutan dari tabung sebelumnya ke tabung terakhir
- Catatan tabung terakhir dianggap kosong dari tabung sebelumnya



Gambar 4. 1 Langkah pengenceran *working solution*

4) *Biotinylated Detection Ab working solution*

Jumlah larutan yang diperlukan dihitung sebelum percobaan (100 $\mu\text{L}/\text{well}$).

Dalam persiapan sebaiknya disiapkan lebih dari jumlah yang dihitung.

Sebelum digunakan, tabung stok disentrifus dan 100 \times *Concentrated Biotinylated Detection Ab* diencerkan menjadi 1 \times *working solution* dengan pengencer *Biotinylated Detection Ab*.

5) *Concentrated HRP Conjugate working solution*

Jumlah larutan yang dibutuhkan dihitung sebelum percobaan (100 $\mu\text{L}/\text{well}$).

Dalam persiapan sebaiknya disiapkan lebih dari jumlah yang dihitung.

100 \times *Concentrated HRP Conjugate* diencerkan menjadi 1 \times *working solution* dengan pengencer *Concentrated HRP Conjugate Diluent*.

c. Prosedur

- 1) Ditambahkan 100 μL larutan standar atau sampel ke setiap *well*. Diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$.

- 2) Larutan dikeluarkan dan ditambahkan 100 μL *Biotinylated Detection Ab working solution*. Kemudian *well* ditutup dengan *plate sealer* dan dicampur dengan lembut. Selanjutnya diinkubasi selama 1.
- 3) Larutan dituang dari setiap *well*, ditambahkan 350 μL *wash buffer* ke setiap *well* lalu direndam selama 1-2 menit. Larutan dituang dari masing-masing wadah lalu ditepuk-tepuk hingga kering pada kertas penyerap yang bersih. Langkah pencucian ini diulang sebanyak 3 kali.
- 4) Ditambahkan 100 μL *HRP Conjugate working solution*, ditutup dengan *Plate sealer*.
- 5) Diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C.
- 6) Larutan diaspirasi dan dicuci sebanyak 5 kali.
- 7) Ditambahkan 90 μL Reagen Substrat dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C dan ditambahkan 50 μL *Stop Solution*.
- 8) *Optical density* (nilai OD) ditentukan setiap *well* sekaligus melakukan pengaturan *micro-plate reader* ke 450 nm dan dilakukan perhitungan hasil (Elabscience, 2020)

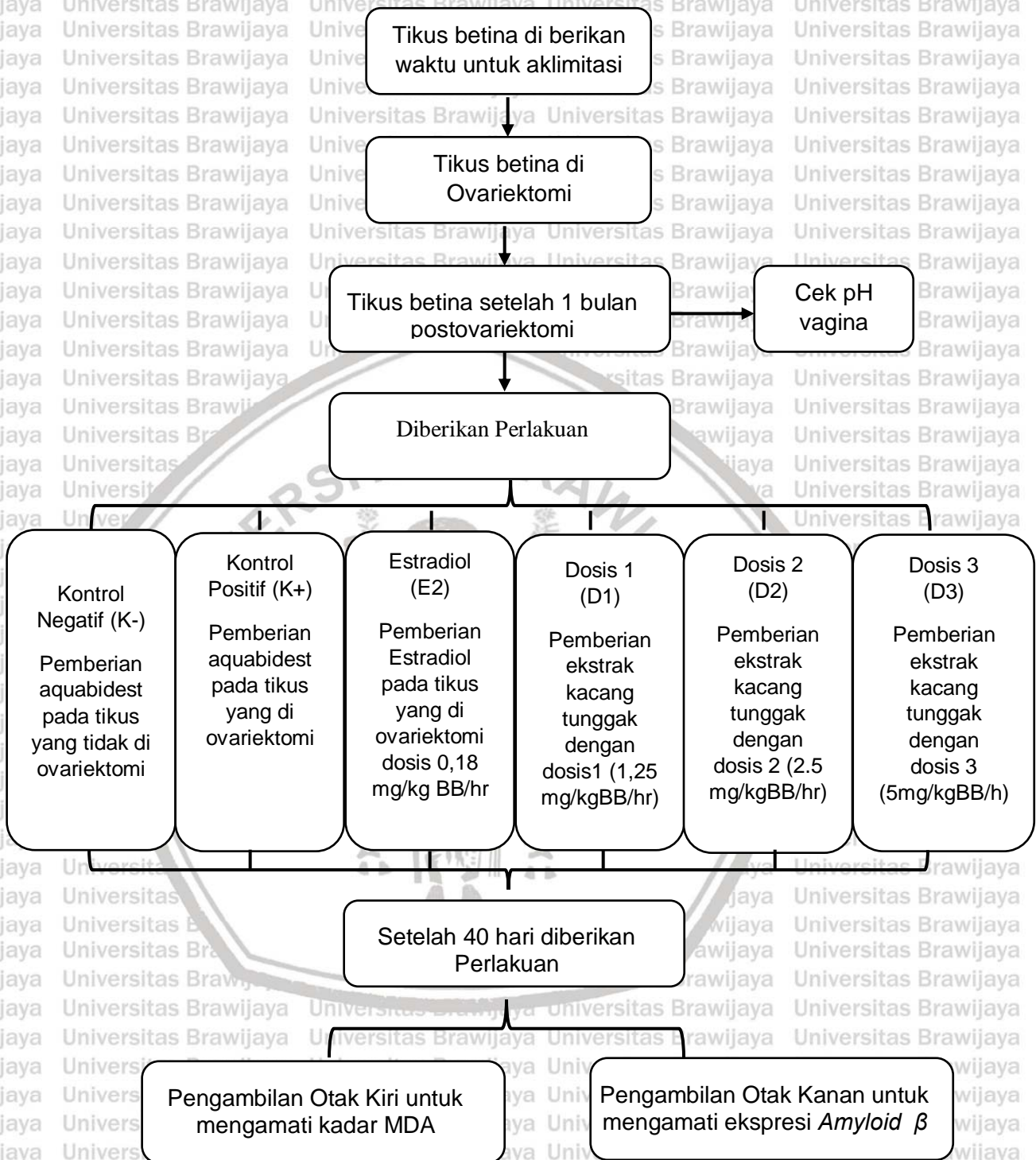
d. Penghitungan Hasil

Rata-rata pembacaan duplikat dihitung untuk setiap standar dan sampel, lalu dikurangi standar rata-rata nol OD. Plot empat parameter kurva logistik pada kertas grafik log-log, dengan konsentrasi standar pada sumbu x dan nilai OD pada sumbu y. Jika sampel telah diencerkan, konsentrasi yang dihitung dari kurva standar harus dikalikan dengan faktor pengenceran. Jika OD sampel melebihi batas atas kurva standar, maka harus dilakukan pengujian kembali dengan pengenceran yang sesuai.

4.4.3. Prosedur *Immunofluorescence* assay dan Pengamatan Ekspresi *Amyloid β*

- a. Slide dipanaskan pada suhu 60 °C selama \pm 5 menit.
- b. Selanjutnya direndam dalam larutan-larutan dibawah ini
 - 1) Xilol (2x10 menit)
 - 2) Ethanol 90% (1 x 5 menit)
 - 3) Ethanol 80% (1 x 5 menit)
 - 4) Ethanol 70% (1 x 5 menit)
 - 5) Aquades seteril (3 x 5 menit)
- c. Antigen Retrival dengan Buffer Sitrat
 - 1) Slide di rendam dalam chamber berisi buffer sitrat dengan pH 6.0
 - 2) Selanjutnya dimasukkan kedalam *waterbath* \pm selama 20 menit dengan suhu 95 °C. Keluarkan dari *waterbath* \pm 20 menit suhu ruang
- d. Slide selanjutnya di cuci menggunakan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) sebanyak 3 kali setiap 5 menit
- e. Cuci dengan PBS Triton-X 100 0.1 % selama 1 kali dalam 5 menit.
- f. Slide kemudian di inkubasi menggunakan 1 % *Bovine Serum Albumin* (BSA) selama 30 menit dengan suhu ruang dan membuang larutan BSA yang sudah digunakan
- g. Slide kemudian di inkubasi dengan Antibodi sekunder selama \pm semalaman dengan suhu 4 °C
- h. Mencuci slide dengan larutan PBS sebanyak 3 kali dalam 5 menit.
- i. Melakukan inkubasi dengan DPAI 1:1000 selama 5 menit
- j. Mencuci slide dengan PBS sebanyak 3 kali dalam 5 menit
- k. Kemudian menutup *Mounting Medium* dengan *cover glass*
- l. Melakukan pengamatan menggunakan Mikroskop *Flourescence*

4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Analisa Data

Pembuktian hipotesis pada peneitian ini menggunakan pendekatan statistik dengan uji statistica parametrik, hal ini dilakukan karena semua data penelitian berskala rasio. Sebelumnya, data akan di analisis dengan uji prasyarat parametrik untuk menunjukkan bahwa data termasuk dalam kategori tersebar atau terdistribusi normal atau tidak terdistridusi normal. Uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* karena ukuran sampel yang kecil.

Kriteria keputusan dikategorikan berdasarkan nilai probabilitas kesalahan empiric pada nilai *Sig* atau *p-value* yaitu jika menunjukkan nilai yang lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$, maka data disimpulkan berdistribusi normal dan uji parametrik dapat digunakan. Namun jika *p-value* menunjukkan nilai yang lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0,05$ maka uji parametrik tidak dapat digunakan sehingga menggunakan uji statistika non parametrik (Santoso, 2005). Adapun variabel terukur yang diuji dengan uji prasarat parametrik adalah data kadar MDA otak dan ekspresi Amyloid β pada otak.

Jika sudah diketahui bahwa data terdistribusi normal maka selanjutnya digunakan *One Way Anova* (Uji F) untuk membuktikan hipotesis peneitian. Apabila pada uji *One Way Anova* menghasilkan kesimpulan H_0 ditolak atau ada perbedaan yang bermakna ($p\text{-value} < 0,05$), maka analisis dilanjutkan dengan uji perbandingan berganda, yaitu dipilih uji Beda Nyata Terkecil (BNT) atau *Least Significant Difference* (LSD) (Steel and Torrie, 1995). Tujuan digunakan LSD adalah untuk mengetahui perbedaan yang bermakna antara beberapa kelompok yang dibandingkan.. Kriteria keputusan berdasarkan nilai *Sig* atau *p-value*. Jika $p\text{-value} > \alpha = 0,05$ maka disimpulkan tidak ada korelasi yang bermakna antar dua variabel. Namun jika $p\text{-value} < \alpha = 0,05$ maka disimpulkan ada korelasi yang bermakna antar dua variabel. Tingkat keeratan hubungan (koefisien korelasi/KK) dapat diartikan dalam tujuh tingkatan sebagai berikut : (Hasan, 2012)

$KK = 0$ tidak ada korelasi

$0 < KK \leq 0.20$, korelasi sangat rendah / lemah tapi pasti.

$0.20 < KK \leq 0.40$, korelasi rendah/ lemah tapi pasti.

$0.40 < KK \leq 0.70$, korelasi yang cukup berarti.

$0.70 < KK \leq 0.90$, korelasi yang tinggi/ kuat.

$0.90 < KK \leq 1.00$, korelasi sangat tinggi/ kuat sekali/ dapat diandalkan.

$KK = 1$, korelasi sempurna

Penghitungan analisis data dilakukan dengan menggunakan SPSS 16.



BAB 5

HASIL PENELITIAN

5.1 Kataristik Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *in vivo* dengan menggunakan *Rattus norvegicus strain Wistar* sebagai hewan coba. *Rattus* berjumlah 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dengan masing-masing terdiri dari 5 ekor. Kelompok kontrol negatif (K-) merupakan kelompok yang tidak dilakukan ovariektomi dan tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), sementara kelompok positif (K+) merupakan kelompok yang dilakukan tindakan ovariektomi tanpa mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak. Kelompok perlakuan 1 (KP 1), perlakuan 2 (KP 2), perlakuan 3 (KP 3), dan perlakuan 4 (KP 4) merupakan kelompok yang dilakukan tindakan ovariektomi dan diberikan estradiol 0.18 mg/kg BB/hr diberikan ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 1,25 mg/kg BB/hr, 2.5 mg/kg BB/hr, dan 5 mg/kg BB/hr, dan selama 40 hari.

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan pada penelitian Khusniyati et al (2014) dengan pemberian dosis 1.25 mg/kg BB/hr, 2.5 mg/kg BB/hr, dan 5 mg/kgBB/hr. Dalam menentukan dosis yang diberikan peneliti melakukan penimbangan berat badan tikus secara berkala setiap 10 hari. Tindakan ovariektomi dilakukan pada hewan coba dilakukan agar terjadi penurunan hormone estrogen sehingga keadaan hewan coba menyerupai keadaan menopause. Penurunan estrogen secara optimal terjadi pada hari ke 28 setelah dilakukan tindakan ovariektomi menurut (Wiyasa, 2019).

5.2 Hasil Uji Prasyarat Parametrik

Dalam penelitian ini hasil analisis data pada uji normalitas dilakukan dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji ini dapat dilakukan dengan kriteria bila data terdistribusi normal dengan nilai Sig atau *p-value* lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Namun, jika data tidak terdistribusi normal dengan nilai Sig atau *p-value* lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Pada analisis uji *Shapiro-Wilk* dijelaskan secara rinci pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. 1 Hasil Uji Normalitas Data

Kelompok Pengamatan	<i>p-value</i>		distribusi
	Kadar MDA	Ekspresi Amyloid β	
Kontrol Negatif (K-)	0.808	0.570	normal
Kontrol Positif (K+)	0.985	0.275	normal
OVX + Estradiol 0.18 mg/kg BB/hr	0.238	0.290	normal
OVX + EKT 1.25 mg/kg BB/hr	0.055	0.284	normal
OVX + EKT 2.5 mg/kg BB/hr	0.246	0.453	normal
OVX + EKT 5 mg/kg BB/hr	0.293	0.318n	normal

Pada tabel 5.1 berdasarkan hasil uji *Shapiro-Wilk* diperoleh kadar MDA dan ekspresi Amyloid β untuk masing-masing kelompok pengamatan telah menunjukkan nilai *p-value* yang semuanya lebih besar dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$. Hal ini menunjukkan semua data terdistriusi normal dan memenuhi untuk prasyarat dilakukan uji parametrik. Selanjutnya data di analisis dengan uji statistika parametrik untuk membuktikan hipotesis penelitian yang telah diajukan.

5.3 Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak Terhadap Kadar MDA pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariectomy

Berdasarkan hasil uji coba *Anova one way* pada data kadar MDA pada otak tikus yang berikan perlakuan ovariectomy diperoleh perbedaan yang bermakna dengan rerata kadar MDA kelima kelompok sampel pengamatan. Hal ini ditunjukkan dengan nilai *p-value* = 0.000 < α . Selanjutnya pada uji perbandingan

berganda dengan uji Beda Nyata Terkecil / BNT diperoleh dan ditampilkan secara lengkap pada tabel berikut.

Tabel 5. 2 Pengaruh Ekstrak Etanol Kacang Tunggak Terhadap Kadar MDA pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi

Kelompok Perlakuan	N	MDA (nmol/mL) Rerata ± SD	p-value
Kontrol Negatif (K-)	4	3.18±0.018 ^{ab}	0.008
Kontrol Positif (K+)	4	3.38±0.204 ^a	
OVX + Estradiol 0.18 mg/kg BB/hr	4	3.07±0.208 ^{bc}	
OVX + EKT 1.25 mg/kg BB/hr	4	3.11±0.164 ^{bc}	
OVX + EKT 2.5 mg/kg BB/hr	4	3.09±0.148 ^{bc}	
OVX + EKT 5 mg/kg BB/hr	4	2.86±0.142 ^c	

Keterangan : Pada rerata ± sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (*p value* < 0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (*p value* < 0.05).

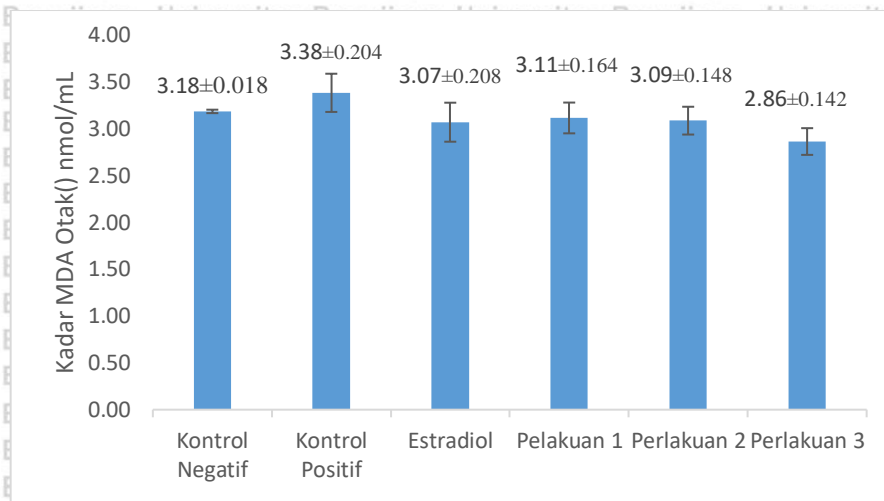
Pada Tabel 5.2 berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan bahwa ada peningkatan rerata kadar MDA dari kelompok kontrol negatif (3.18±0.018) ke kelompok kontrol positif (tikus dengan ovariektomi) (3.38±0.204). Tampak rerata kadar MDA otak pada kelompok kontrol positif nilainya lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* yang di ovariektomi sebagai tindakan untuk membuat keadaan menjadi hipoestrogen lebih tinggi jika dibandingkan dengan *Rattus norvegicus* yang sehat/normal.

Dari tabel 5.2 didapatkan data yang menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA otak antara kelompok kontrol positif (*Rattus norvegicus* hipoestrogen) (3.38±0.204^a) dengan kelompok perlakuan pemberian estradiol dosis 0.18 mg/kg/BB/hr (3.07±0.208^{bc}), kelompok perlakuan 1 dengan pemeberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 1.25 mg/kg BB/hr (3.11±0.164^{bc}), kelompok perlakuan 2 dengan pemeberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan dosis 2.5 mg/kg BB/hr (3.09±0.148^{bc}), dan kelompok perlakuan 3

dengan pemberian ekstrak etanol kacang tunggak dengan dosis 5 mg/kg BB/hr ($2.86 \pm 0.142^\circ$).

Hal ini menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol kacang tunggak terhadap kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* yang di ovariektomi. Pengaruh yang dimaksud ialah pemberian ekstrak etanol kacang tunggak mampu menurunkan kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi. Sehingga dapat disimpulkan bahwa hipotesis pertama pada penelitian ini dapat diterima, bahwa pemberian ekstrak etanol kacang tunggak dapat menurunkan kadar MDA pada otak *Rattus norvegicus* tua model ovariektomi.

Berdasarkan uraian hasil dari Tabel 5.2 di atas perlakuan pemberian ekstrak etanol kacang tunggak berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap penurunan kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi. Selain itu ditemukan dosis ekstrak etanol kacang tunggak yang paling optimum untuk menurunkan kadar MDA adalah dosis 5 mg/kg/BB/hari. Hal ini dapat terlihat dari rerata kadar MDA otak pada otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi dengan pemberian ekstrak etanol kacang tunggak dosis 5 mg/kgBB/hr memiliki nilai paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan dengan pemberian dosis 1.25 mg/kgBB/hr dan 2.5 mg/kgBB/hr. Perbedaan rerata kadar MDA pada ke enam kelompok sampel tersebut disajikan secara lengkap tampak pada gambar histogram di bawah ini.



Gambar 5. 1 Histogram Pengaruh Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* yang di ovariektomi

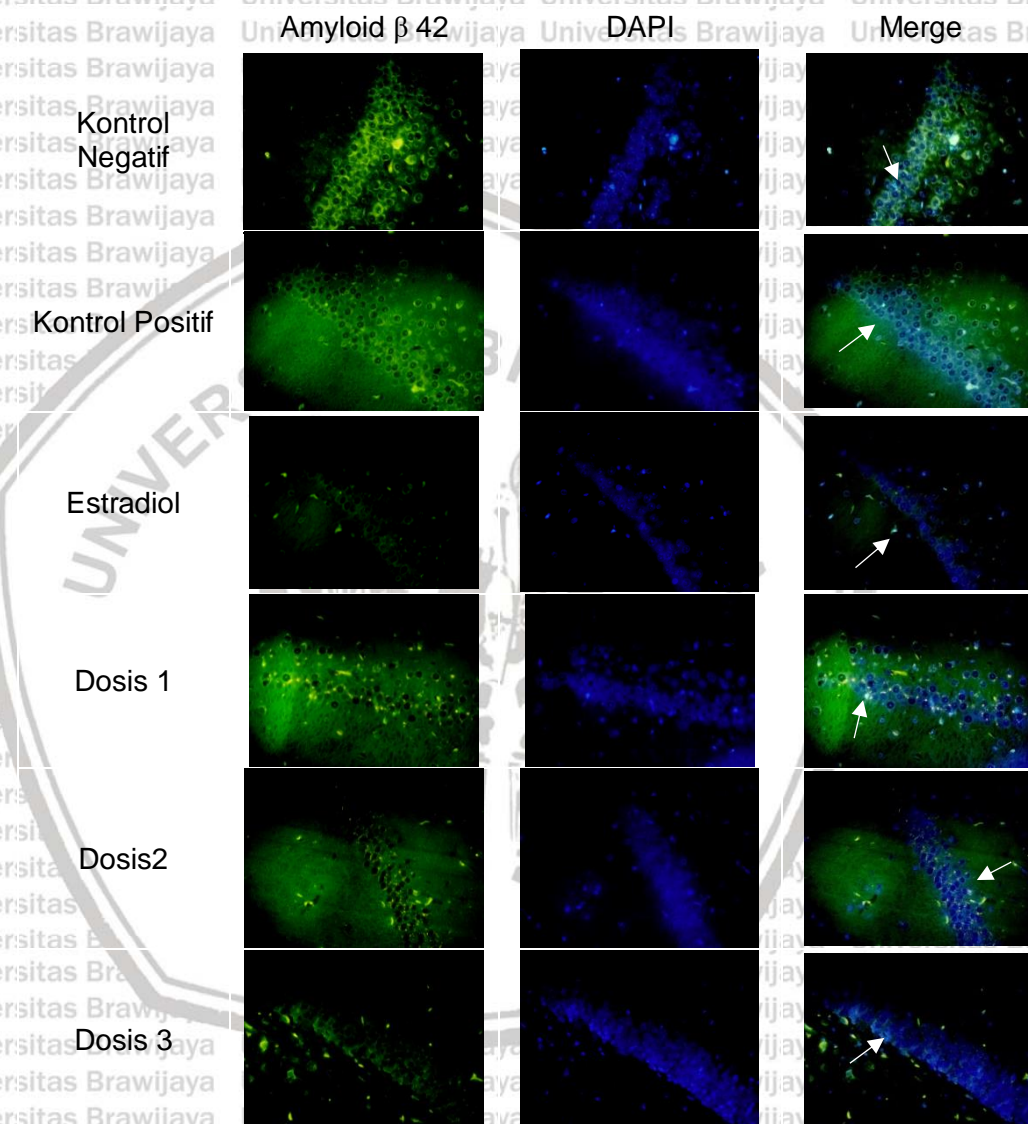
Pada gambar 5.1 menunjukkan histogram rerata \pm standar deviasi kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi keenam kelompok sampel pengamatan dengan perlakuan pemberian estradiol dosis 0.18 mg/kgBB/hr, ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hr, 2.5 mg/kgBB/hr, dan 5 mg/kgBB/hr. Bila dilihat berdasarkan nilai rerata kadar MDA otak antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif terlihat ada peningkatan pada rerata kadar MDA otak.

Sementara ditemukan adanya penurunan yang bermakna rerata kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi antara kelompok kontrol positif dengan kekelompok kontrol perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak berturut-turut mulai dari dosis 1.25 mg/kgBB/hr, 2.5 mg/kgBB/hr dan 5 mg/kgBB/hr. Dari gambar 5.1 tampak nilai rerata kadar MDA otak semakin menurun seiring dengan bertambahnya dosis yang diberikan. Hal ini berarti bahwa pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hr sudah mampu menurunkan kadar MDA otak pada *Rattus norvegicus* tua yang di ovariektomi.

Tampak pada gambar 5.1 diatas terlihat tren peningkatan rerata kadar MDA dari kelompok kontrol negatif ke kelompok kontrol positif. Sementara itu tampak penurunan kadar MDA otak *Rattus norvegicus* tua yang di Ovariektomi seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak ethanol kacang tunggak yang diberikan. Nilai kadar MDA otak *Rattus norvegicus* tua yang di Ovariektomi yang tertinggi tapak pada kelompok kontrol positif (3.38 ± 0.204) dan nilai kadar MDA otak *Rattus norvegicus* tua yang di Ovariektomi terendah ditunjukkan pada kelompok perlakuan 3 dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 5 mg mg/kgBB/hr. Melalui uji *Pearson* yang dilakukan untuk mengetahui keeratan hubungan antara pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan kadar MDA otak di dapatkan keeratan yang bermakna dengan *p-value* lebih kecil dari taraf signifikansi $\alpha = 0.05$ (*p value 0.002*). Keeratan hubungan antara pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dengan kadar MDA otak dalam kategori kolerasi yang kuat (-0.707). Sehingga dapat disimpulkan semakin tinggi dosis pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak semakin menurunkan kadar MDA otak *Rattus norvegicus*.

5.4 Pengaruh Ekstrak Kacang Tunggak terhadap Ekspresi *Amyloid β* pada Otak Tikus Putih Model Ovariektomi.

Hasil pemeriksaan *Immunofluorescence assay* yang dilakukan pada sampel kelompok kontrol negatif, kontrol positif, pemberian dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 dengan pembesaran 800 x menggunakan mikroskop.



Gambar 5. 2 Ekspresi *Amyloid β* diamati dengan mikroskop *Immunoflorescence* dengan perbesaran 400x

Berdasarkan hasil uji *Anova one way* pada data ekspresi *Amyloid β* pada Otak pada tikus yang dilakukan ovariektomi diperoleh ada perbedaan yang bermakna rerata ekspresi *Amyloid β* keenam kelompok sampel pengamatan, hal ini ditunjukkan dengan nilai $p\text{-value} = 0.000 < \alpha$. Selanjutnya pada uji perbandingan

berganda dengan uji Beda Nyata Terkecil/BNT diperoleh dan ditampilkan secara lengkap disajikan pada tabel dibawah ini.

Tabel 5. 3 Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak Terhadap Ekspresi Amyloid β pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus* Model Ovariektomi)

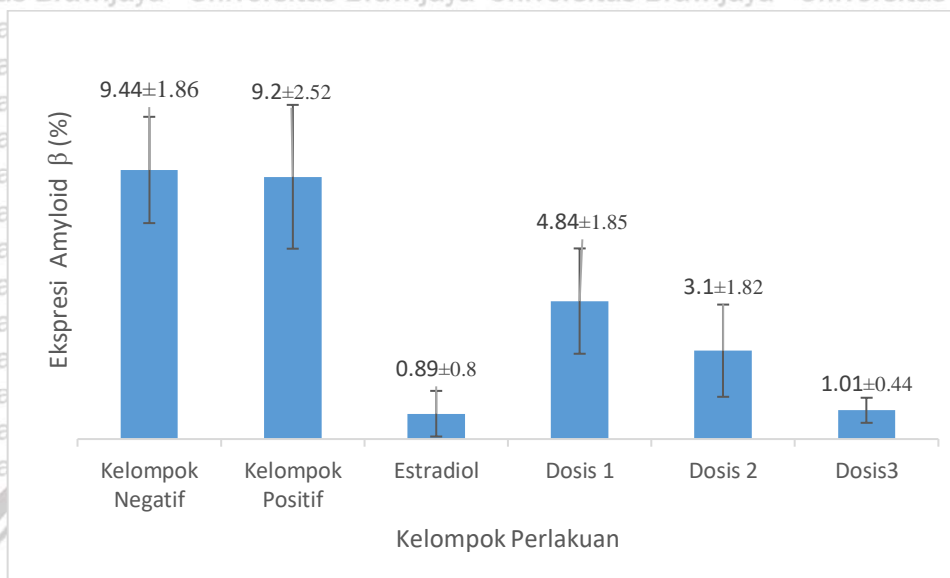
Kelompok Perlakuan	N	Ekspresi Amyloid β Rerata (%) \pm SD	p-value
Kontrol Negatif (sham)	4	9.44 \pm 1.86 ^a	0.000
Kontrol Positif (ovx)	4	9.2 \pm 2.52 ^a	
OVX + Estradiol 0.18 mg/kg BB/hari	4	0.89 \pm 0.8 ^c	
OVX + EKT 1.25 mg/kg BB/hari	4	4.84 \pm 1.85 ^b	
OVX + EKT 2.5 mg/kg BB/hari	4	3.1 \pm 1.62 ^{bc}	
OVX + EKT 5 mg/kg BB/hari	4	1.01 \pm 0.44 ^c	

Keterangan : Pada rerata \pm sd jika memuat huruf yang berbeda berarti ada perbedaan yang bermakna (p value < 0.05) dan jika memuat huruf yang sama berarti tidak ada perbedaan yang bermakna (p value < 0.05).

Pada tabel 5.3 berdasarkan hasil uji perbandingan berganda dengan uji BNT menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar MDA antara kelompok kontrol positif (tikus yang di ovariektomi) (9.2 \pm 2.52^a) dengan perlakuan perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hari (4.84 \pm 1.85^b), 2.5 mg/kgBB/hari (3.1 \pm 1.62^{bc}), dan 5 (1.01 \pm 0.44^c) mg/kgBB/hari. Hal ini berarti bahwa perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25/kgBB/hari mg, 2.5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari memiliki pengaruh terhadap ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus putih tua yang dilakukan ovariektomi, yaitu mampu menurunkan ekspresi *Amyloid β* . Tampak terjadi penurunan kadar ekspresi *Amyloid β* seiring dengan peningkatan dosis ekstrak ethanol kacang tunggak yang diberikan pada tikus dengan ovariektomi. Jadi hipotesis kedua telah terbukti, yaitu pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dapat menurunkan ekspresi *Amyloid β* pada otak tikus tua model ovariektomi.

Selanjutnya dari tabel 5.3 juga dapat dilihat tidak terdapat perbedaan yang bermakna rerata ekspresi *Amyloid β* antara kelompok perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hari dengan dosis 2.5 mg/kgBB/hari, dan juga dengan dosis 5 mg/kgBB/hari. Sehingga dapat dikatakan

bahwa perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak berbagai dosis berpengaruh bermakna terhadap penurunan ekspresi Amyloid β pada otak tikus putih tua yang di ovariektomi.



Gambar 5. 3 Histogram Pengaruh Ekstrak Etanol Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Ekspresi Amyloid β Otak pada *Rattus norvegicus* model Ovariektomi

Pada Gambar 5.4 menunjukkan histogram rerata \pm standar deviasi ekspresi Amyloid β pada otak tikus putih model ovariektomi keenam kelompok sampel pengamatan dengan perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak dosis 1.25 mg/kgBB/hari, 2.5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari. Bila dilihat berdasarkan nilai rerata ekspresi Amyloid β antara kelompok kontrol negatif ke kelompok kontrol positif terlihat ada peningkatan ekspresi Amyloid β yang meskipun tidak bermakna. Sedangkan rerata ekspresi Amyloid β dan terlihat terjadi penurunan yang bermakna rerata ekspresi Amyloid antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak berturut-turut dengan dosis 1.25 mg/kgBB/hari, 2.5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari.

Tampak pada Gambar 5.3 di atas terlihat tren peningkatan rerata ekspresi Amyloid β dari kelompok kontrol negatif ke kelompok kontrol positif. Selanjutnya ada penurunan rerata ekspresi Amyloid β seiring dengan ovariektomi. Nilai

rerata ekspresi *Amyloid* β yang terendah adalah kelompok dosis 5 mg/kgBB/hari dan nilai tersebut merupakan nilai yang terdekat dengan nilai rerata ekspresi *Amyloid* β kelompok pemberian estradiol sebagai terapi yang sering diberikan pada wanita menopause. Sehingga dapat dikatakan dosis ekstrak ethanol kacang tunggak yang paling efektif menurunkan ekspresi *Amyloid* β otak pada tikus putih model ovariektomi adalah dosis 5mg/kgBB/hari.



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Kadar MDA Otak Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) model Ovariektomi

Berdasarkan tabel 5.2 menunjukkan bahwa ada perbedaan yang bermakna rerata kadar *Malondialdehyde* (MDA) otak antara kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan) (3.18 ± 0.018) dengan kelompok kontrol positif (dilakukan ovariektomi) (3.38 ± 0.204). Hal ini berarti bahwa pada *Rattus norvegicus* yang dilakukan ovariektomi memiliki kadar MDA otak yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Rattus norvegicus* yang tidak di ovariektomi.

Berkurangnya hormon estrogen secara drastis saat menopause akan menyebabkan penurunan antioksidan endogen seperti SOD (*Superoxide Dismutase*), beberapa peroksidase dan katalase yang memiliki peran mencegah terjadinya peningkatan ROS. Proses perjalanan mula Alzheimer pada wanita menopause dapat terjadi ketika ROS meningkat secara berlebihan pada Otak.

Jumlah ROS yang tidak sebanding dengan antioksidan membuat mekanisme penghilangan ROS menjadi terganggu dan mengakibatkan terjadinya Stres Oksidatif (SO). Kerusakan yang ditimbulkan dapat berupa peningkatan Ca^{2+} bebas intraseluler, kerusakan protein dan peroksidasi lipid (Di Meo & Venditti, 2020).

Berkurangnya hormon estrogen saat menopause memicu peningkatan SO yang dapat menstimulasi peningkatan Peroksidasi Lipid di otak. Kandungan Polyunsaturated fatty acids (PUFA) pada otak rentan bereaksi dengan ROS yang memiliki sifat reaktif dan menghasilkan produk akhir berupa MDA (Morales & Munné-Bosch, 2019). Penurunan hormon estrogen berpengaruh terhadap antioksidan eksogen dan yang menurun dan peningkatan SO yang dapat

meningkatkan kadar MDA di otak melalui peroksidasi lipid (Montoya-estrada *et al.*, 2020).

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pourganji (2014) pada hewan coba tikus *wistar* betina yang di ovariektomi berusia 12 minggu. Hasil penelitian menunjukkan kadar MDA otak tikus pada kelompok yang di ovariektomi lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok sham. Otak memerlukan energi dan konsumsi Oksigen sepuluh kali lebih besar dibandingkan dengan organ tubuh lainnya. Hal ini menyebabkan terdapat lebih banyak mitokondria yang terapat di otak untuk mendukung proses pembuatan dan kebutuhan ATP. Selain menghasilkan produk yang dibutuhkan, mitokondria menghasilkan produk radikal bebas berupa ROS. Produksi ROS yang berlebihan dari mitokondria dipercaya sebagai penyeab dari terjadinya neurodegeneratif salah satunya Alzheimer (Angelova & Abramov, 2018).

Pada masa menopause seorang wanita akan mengalami penurunan drastis dari hormon estrogen yang dimilikinya. Hormon estrogen tersebut memiliki peran penting dalam menginduksi antioksidan endogen seperti MnSOD. Antioksidan diperlukan tubuh sebagai upaya untuk menetralsir produk radikal bebas yang dihasilkan otak. Peningkatan ROS di otak pada masa menopause mengakibatkan terjadinya kerusakan pada sel neuron. ROS menginduksi PUFA yang terdapat di otak dan mengakibatkan terjadinya Lipid Peoksidasi. MDA merupakan salah satu produk yang di hasilkan Lipid peroksidasi dan menjadi penanda dari SO. MDA menyebabkan perubahan selektif dalam pensinyalan pada sel, kerusakan protein dan DNA, dan sitotoksisitas hingga mengakibatkan terjadinya apoptosis sel (Raz, 2014; Ramana *et al.*, 2019).

Malondiadehyde (MDA) merupakan salah satu dari produk akhir dari Lipid Peroksidasi. Produk Lipid Peroksidasi memeiliki sifat reaktif terhadap sel disekitarnya dan menyebabkan kerusakan protein, DNA, dan sitotoksisitas.

Beberapa penelitian telah mengamati keberadaan MDA sebagai salah satu penyebab terjadinya penyakit Alzheimer melalui jalur oksidatif. Oleh karena itu mengurangi pembentukan MDA yang diinduksi ROS dapat bermanfaat dalam mencegah terjadinya Alzheimer pada wanita menopause (Ramana *et al.*, 2019).

Otak dapat menghasilkan estrogen dengan mengolah kolesterol yang dimiliki. Estrogen yang dihasilkan otak dapat membantu dalam mempertahankan neuron agar tetap sehat dengan mencegah kerusakan sel dan memicu terjadinya apoptosis (Rettberg *et al.*, 2014). Lagranha (2018) dalam literturnya

menceritakan sebuah penelitian pengamatan pada hipokampus *Rattus norvegicus* yang mengalami defisiensi estrogen karena tindakan ovariectomi mengalami peningkatan stress oksidatif yang diikuti dengan peningkatan kecemasan dan penurunan memori dan kemampuan belajar. Sementara, pemberian terapi estrogen selama dua minggu pada *Rattus norvegicus* dapat mengurangi kerusakan otak dengan meningkatkan kemampuan enzim antioksidan endogen pada neuron.

Dalam penelitian ini ditemukan adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol positif (3.38 ± 0.204^a) dengan kelompok perlakuan 1 (3.11 ± 0.164^{bc}), kelompok perlakuan 2 (3.09 ± 0.148^{bc}), dan kelompok perlakuan 3 (2.86 ± 0.142^c). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh dengan menurunkan kadar MDA otak *Rattus norvegicus* yang di ovariectomi setelah diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak (*Vigna unguiculata*).

Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) merupakan tanaman yang mengandung senyawa alami fitoestrogen. Dengan struktur kimia yang menyerupai hormon estrogen, fitoestrogen dipercaya dapat berikatan dengan Estrogen Reseptor (ER) di otak (Kim & Park, 2012). Jenis fitoestrogen yang paling banyak ditemukan dalam jenis tumbuh-tumbuhan adalah isoflavon jenis Genistein.

Sebagai bentuk isoflavon utama dari Kacang Tunggak, genistein ($4', 5, 7$ -trihydroxyisoflavone) memiliki basis cincin fenolik dan jarak yang mirip antara

gugus 4'- dan 7'- hidroksil dengan estradiol yang merupakan estrogen endogen.

Hal ini memungkinkan genistein meningkatkan kadar kolin asetiltransferase dan mRNA faktor pertumbuhan saraf di daerah hipokampus, dengan bertindak sebagai agonis estrogen. Sehingga genistein dapat meningkatkan fungsi kognitif dan perkembangan synaps di daerah hipokampus pada hewan coba (Devi *et al.*, 2017).

Manfaat genistein telah dibuktikan Braxas *et al* (2019) pada wanita postmenopause di Rumah Sakit Dr. Gholipour Boukan, Iran yang berikan intervensi berupa pemberian 2 kapsul mengandung 54 mg genistein dengan kemurnian >98% setiap hari selama 12 minggu. Dalam penelitian tersebut didapatkan hasil berupa adanya penurunan yang signifikan (*p value 0.001*) pada kadar MDA serum wanita postmenopause. Sejalan dengan penelitian tersebut, dalam penelitian ini juga ditemukan hasil adanya penurunan signifikan pada kadar MDA otak *Rattus norvegicus* yang di ovariectomi untuk mendapatkan keadaan hipoestrogen menyerupai keadaan menopause yang diberikan ekstrak ethanol kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dengan dosis 1.25 mg/kgBB/hr, 2.5 mg/kgBB/hr, dan 5 mg/kgBB/hr.

6.2 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Ekspresi Amyloid β Otak Pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) model Ovariectomi

Meskipun memiliki perbedaan tidak bermakna berdasarkan data yang disajikan pada tabel 5.3 menunjukkan adanya peningkatan dari rerata ekspresi Amyloid β antara kelompok kontrol negatif (sham) (9.44 ± 1.86^a) dengan kelompok kontrol positif (*Rattus norvegicus* dengan ovariectomi) (9.2 ± 2.52^a). Hal ini menunjukkan pada *Rattus norvegicus* yang di ovriectomi terjadi peningkatan

ekspresi Amyloid β yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Rattus norvegicus* normal.

Seperti yang telah dibahas sebelumnya bahwa Amyloid β dipercaya sebagai penyebab dari terjadinya penyakit Alzheimer dengan kebanyakan penderitanya adalah wanita menopause. Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Mosconi *et al* (2018) yang membuktikan adanya perkembangan amyloidosis pada otak yang lebih berat pada wanita menopause dibandingkan dengan pria yang seusia. Penyebabnya ialah jaringan reseptor estrogen merupakan salah satu sistem pengatur utama pada otak. Sehingga penurunan hormon estrogen dapat berpengaruh terhadap kemampuan otak untuk mengatur metabolisme energi pada sel neuron. Hal ini dapat mempengaruhi kemampuan neuron pada hipokampus dalam mengatur memori penting dalam melakukan aktivitas sehari-hari (Scheyer *et al.*, 2018).

Terjadi peningkatan rerata ekspresi Amyloid β pada kelompok kontrol positif jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dalam penelitain ini. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan eksprsri Amyloid β saat terjadi penurunan hormon estrogen saat menopsuse dengan tindakan ovariektomi pada hewan coba. Defesiensi estrogen yang terjadi pada masa menopause juga dipercaya dapat meningkatkan terjadinya penyakit Alzheimer (Cheignon *et al.*, 2018). Mekanisme kerusakan neuron terjadi akibat penumpukkan Amyloid β yang dapat berinteraksi dengan mitokondria dengan memicu gangguan homeostatis ionik didalam sel dengan meningkatkan masuknya Kalsium (Ca^{2+}) kedalam sitoplasma dengan mengaktivasi *N-methyl D-aspartate* (NMDA) secara berlebihan seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.4. Terganggunya homestatis Ca^{2+} pada neuron dapat menyebabkan fungsi mitokondria menjadi terganggu. Kerusakan ini justru menginduksi terbentuknya ROS secara berlebihan yang tidak diimbangin dengan

produksi antioksidan endogen dan menyebabkan kematian sel neuron. (Kamat *et al.*, 2016).

Pada hasil penelitian yang disajikan pada tabel 5.3 terlihat adanya penurunan rerata ekspresi Amyloid β seiring dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak berturut-turut dengan dosis 1.25 mg/kgBB/hari, 2.5 mg/kgBB/hari, dan 5 mg/kgBB/hari. Hal ini dikarenakan Kacang Tunggak memiliki kandungan senyawa fitoestrogen yang menyerupai hormon estrogen yang mampu berikatan dengan estrogen reseptor di otak. Sehingga dapat menginduksi hormon estrogen dalam memproduksi antioksidan endogen untuk menetralkan ROS dan mencegah terjadinya kerusakan sel neuron (Koebele & Bimonte-Nelson, 2016).

Sebagai tanaman yang memiliki kandungan fitoestrogen pada KacangTunggak terdapat jenis isoflavon utama berupa genistein (Kim & Park, 2012). Dari hasil penelitian ini dapat dilihat adanya penurunan rerata ekspresi Amyloid β , seiring dengan pemberian ekstrak ethanol kacang tunggak. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian dari Petry *et al.* (2020) yang menggunakan neuroblastoma manusia SH-SY5Y diperoleh dari *Cell Bank of Rio de Janeiro* kemudian diberikan terapi Genistein selama 24 jam yang dilarutkan dalam pelarut *Dimethyl Sufoxide* (10 mg/L) dan disimpan pada suhu -20 C sebelum akhirnya digunakan. Dari penelitian ini ditemukan adanya kemampuan genistein secara signifikan dalam mengurangi kematian sel yang diinduksi peptida Amyloid β . Genistein menunjukkan peran reseptor estrogen dan mencegah setidaknya sebagian apoptosis sel neuron yang diinduksi Amyloid β dengan mengurangi stres oksidatif. Selain itu genistein melalui reseptor estrogen mencegah terjadinya apoptosis dengan mencegah masuknya Ca^{2+} melalui reseptor glutamat ion tropik pada mitokondria (Uddin & Kabir, 2019).

6.3 Keterbatasan Penelitian

Menopause seharusnya didiagnosa secara pasti dengan pemeriksaan kadar hormon estrogen. Dalam penelitian ini tidak dilakukan pemeriksaan lebih lanjut untuk menegakkan diagnosa menopause seperti pemeriksaan kadar LH, FSH dan E2 pada hewan coba. Selain itu Alzheimer merupakan salah satu penyakit degeneratif yang disebabkan oleh penumpukkan peptida Amyloid β . Penyakit Alzheimer menyebabkan terjadinya gangguan kognitif akibat adanya penurunan aktivitas metabolik dan hilangnya neuron dimulai di korteks entorhinal dan hipokampus pada wilayah CA1 pada penderitanya. Dampak yang terjadi dapat berupa kehilangan memori dalam pembelajaran, dan perilaku emosional yang dapat berlanjut ketahap disorientasi, kebingungan, perubahan perilaku utama, seperti agresi dan agitasi, dan gejala neuropsikiatri, seperti delusi dan halusinasi. Dalam penelitian ini belum dapat mengamati pengaruh ekstrak ethanol kacang tunggak sebagai antioksidan terhadap gangguan kognitif pada penderita Alzheimer.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1. Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dalam berbagai dosis mampu menurunkan kadar *Malondialdehyde* (MDA) pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi.

7.1.2. Ekstrak Etanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) dalam berbagai dosis mampu menurunkan ekspresi Amyloid β pada otak tikus putih (*Rattus norvegicus*) model ovariektomi.

7.2 Saran

Peneliti selanjutnya diharapkan dapat melakukan uji kadar FSH, LH, dan E2 sebagai penentu pasti keadaan menopause pada hewan coba. Selain itu, pengamatan pengaruh ekstrak etanol kacang tunggak terhadap penurunan kognitif seperti berupa kehilangan memori dalam pembelajaran, dan perilaku emosional pada penderita hewan coba model Alzheimer terutama yang disebabkan karena menopause.

DAFTAR PUSTAKA

- Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B.J., Shaman, A. & Gupta, S. (2012), "The effects of oxidative stress on female reproduction: A review", *Reproductive Biology and Endocrinology*, Reproductive Biology and Endocrinology, Vol. 10 No. 1, p. 1.
- Angelova, P.R. & Abramov, A.Y. (2018), "Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration", *FEBS Letters*, Vol. 592 No. 5, pp. 692–702.
- Atri, A. (2019), "The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management", *Medical Clinics of North America*, Elsevier Inc, Vol. 103 No. 2, pp. 263–293.
- Ayala, A., Muñoz, M.F. & Argüelles, S. (2014), "Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2014, available at: <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Bakhtiari, M., Panahi, Y., Ameli, J. & Darvishi, B. (2017), "Protective effects of flavonoids against Alzheimer's disease-related neural dysfunctions", *Biomedicine and Pharmacotherapy*, Elsevier Masson SAS, Vol. 93 No. 2017, pp. 218–229.
- Bodega, G., Alique, M., Puebla, L., Carracedo, J. & Ramírez, R.M. (2019), "Microvesicles: ROS scavengers and ROS producers", *Journal of Extracellular Vesicles*, Taylor & Francis, Vol. 8 No. 1, available at: <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1626654>.
- Braxas, H., Rafrat, M., Karimi Hasanabad, S. & Asghari Jafarabadi, M. (2019), "Effectiveness of Genistein Supplementation on Metabolic Factors and Antioxidant Status in Postmenopausal Women With Type 2 Diabetes Mellitus", *Canadian Journal of Diabetes*, Elsevier Inc, Vol. 43 No. 7, pp. 490–497.
- Cheignon, C., Tomas, M., Bonnefont-Rousselot, D., Faller, P., Hureau, C. & Collin, F. (2018), "Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease", *Redox Biology*, Vol. 14, pp. 450–464.
- Chuang, E., Hori, A.M., Hesketh, C.D. & Shorter, J. (2018), "Amyloid assembly and disassembly", *Journal of Cell Science*, Vol. 131 No. 8, pp. 1–18.
- Deficiency, E. & Lobo, R.A. (2018), *Menopause and Care of the Mature Woman: Endocrinology, Consequences of Estrogen Deficiency, Effects of Hormone Therapy, and Other Treatment Options, Comprehensive Gynecology*, Seventh Ed., Elsevier, available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-32287-4.00014-4>.
- Devi, K.P., Shanmuganathan, B., Manayi, A., Nabavi, S.F. & Nabavi, S.M. (2017), "Molecular and Therapeutic Targets of Genistein in Alzheimer's Disease", *Molecular Neurobiology*, Vol. 54 No. 9, pp. 7028–7041.
- Gaschler, M.M. & Stockwell, B.R. (2017), "Lipid peroxidation in cell death", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier Ltd, Vol. 482 No. 3, pp. 419–425.

Gaugler, J., James, B., Johnson, T., Scholz, K. & Weuve, J. (2016), "2016 Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimer's and Dementia*, Elsevier Inc., Vol. 12 No. 4, pp. 459–509.

Gonçalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E.A.S., Ferreira, L., *et al.* (2016), "Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: Nutritional advantages and constraints", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 96 No. 9, pp. 2941–2951.

Hall, J.E. (2015), "Endocrinology of the Menopause", *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, Elsevier Inc, Vol. 44 No. 3, pp. 485–496.

Hoekman, E.J., Knoester, D., Peters, A.A.W., Jansen, F.W., de Kroon, C.D. & Hilders, C.G.J.M. (2018), "Ovarian survival after pelvic radiation: transposition until the age of 35 years", *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Springer Berlin Heidelberg, Vol. 298 No. 5, pp. 1001–1007.

Hou, S.I.Z., Uzhn, Y.H.U., Hang, B.A.Z., Eng, Z.E.T., An, H.O.G., Ang, Z.H.Y., Ang, Q.I.W., *et al.* (2008), "Excretion of Genistein in Rats", *Blood*, pp. 8354–8359.

Huang, W.J., Zhang, X. & Chen, W.W. (2016), "Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review)", *Biomedical Reports*, Vol. 4 No. 5, pp. 519–522.

Hung, C.W., Chen, Y.C., Hsieh, W.L., Chiou, S.H. & Kao, C.L. (2010), "Ageing and neurodegenerative diseases", *Ageing Research Reviews*, Elsevier B.V., Vol. 9 No. SUPPL., pp. S36–S46.

Kamat, P.K., Kalani, A., Rai, S., Swarnkar, S., Tota, S., Nath, C. & Tyagi, N. (2016), "Mechanism of Oxidative Stress and Synapse Dysfunction in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: Understanding the Therapeutics Strategies", *Molecular Neurobiology*, Vol. 53 No. 1, pp. 648–661.

Khan, H., Ullah, H., Aschner, M., Cheang, W.S. & Akkol, E.K. (2020), "Neuroprotective effects of quercetin in alzheimer's disease", *Biomolecules*, Vol. 10 No. 1, available at:<https://doi.org/10.3390/biom10010059>.

Kim, S.H. & Park, M.J. (2012), "Effects of phytoestrogen on sexual development", *Korean Journal of Pediatrics*, Vol. 55 No. 8, pp. 265–271.

Koebele, S. V. & Bimonte-Nelson, H.A. (2016), "Modeling menopause: The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research", *Maturitas*, Elsevier Ireland Ltd, Vol. 87 No. 2016, pp. 5–17.

Lagranha, C.J., Silva, T.L.A., Silva, S.C.A., Braz, G.R.F., da Silva, A.I., Fernandes, M.P. & Sellitti, D.F. (2018), "Protective effects of estrogen against cardiovascular disease mediated via oxidative stress in the brain", *Life Sciences*, Elsevier Inc, Vol. 192, pp. 190–198.

Lonardi, S., Muñoz-Amatriaín, M., Liang, Q., Shu, S., Wanamaker, S.I., Lo, S., Tanskanen, J., *et al.* (2019), "The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)", *Plant Journal*, Vol. 98 No. 5, pp. 767–782.

Di Meo, S. & Venditti, P. (2020), "Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2020, available at:<https://doi.org/10.1155/2020/9829176>.

- Milisa, I., Ribarič, S. & Poljsak, B. (2018), "Antioxidant vitamins and ageing", *Subcellular Biochemistry*, Vol. 90, pp. 1–23.
- Montoya-estrada, A., Guadalupe, K., Veruete-bedolla, D.B., Ruiz-herrera, J.D., Villarreal-barranca, A., Romo-yañez, J., Ortiz-luna, G.F., *et al.* (2020), "Parameters of Oxidative Stress in Reproductive and Postmenopausal Mexican Women", pp. 1–11.
- Morales, M. & Munné-Bosch, S. (2019), "Malondialdehyde: Facts and artifacts", *Plant Physiology*, Vol. 180 No. 3, pp. 1246–1250.
- Mosconi, L., Rahman, A., Diaz, I., Wu, X., Scheyer, O., Hristov, H.W., Vallabhajosula, S., *et al.* (2018), "Increased Alzheimer's risk during the menopause transition: A 3-year longitudinal brain imaging study", *PLoS ONE*, Vol. 13 No. 12, pp. 1–13.
- Otzen, D. & Riek, R. (2019), "Functional amyloids", *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 11 No. 12, available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033860>.
- Petry, F. dos S., Coelho, B.P., Gaelzer, M.M., Kreutz, F., Guma, F.T.C.R., Salbego, C.G. & Trindade, V.M.T. (2020), "Genistein protects against amyloid-beta-induced toxicity in SH-SY5Y cells by regulation of Akt and Tau phosphorylation", *Phytotherapy Research*, Vol. 34 No. 4, pp. 796–807.
- Phaniendra, A., Jestadi, D.B. & Periyasamy, L. (2015), "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases", *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Vol. 30 No. 1, pp. 11–26.
- Podfigurna-Stopa, A., Czyzyk, A., Grymowicz, M., Smolarczyk, R., Katulski, K., Czajkowski, K. & Meczekalski, B. (2016), "Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects", *Journal of Endocrinological Investigation*.
- Pourganji, M., Hosseini, M., Soukhtanloo, M., Zabihi, H. & Hadjzadeh, M.A. (2014), "Protective role of endogenous ovarian hormones against learning and memory impairments and brain tissues oxidative damage induced by lipopolysaccharide", *Iranian Red Crescent Medical Journal*, Kowsar Medical Institute, Vol. 16 No. 3.
- Ramana, K. V., Srivastava, S. & Singhal, S.S. (2019), "Lipid peroxidation products in human health and disease 2019", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2019 No. Ldl, available at: <https://doi.org/10.1155/2019/7147235>.
- Raz, L. (2014), "Estrogen and cerebrovascular regulation in menopause", *Molecular and Cellular Endocrinology*, Elsevier Ireland Ltd, Vol. 389 No. 1–2, pp. 22–30.
- Reiss, A.B., Arain, H.A., Stecker, M.M., Siegart, N.M. & Kasselman, L.J. (2018), "Amyloid toxicity in Alzheimer's disease", *Reviews in the Neurosciences*, Vol. 29 No. 6, pp. 613–627.
- Rejeki, P.S., Putri, E.A.C. & Prasetya, R.E. (2019), "Ovariektomi pada Tikus dan Mencit", Airlangga University Press.
- Rettberg, J.R., Yao, J. & Brinton, R.D. (2014), "Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body", *Frontiers in Neuroendocrinology*, Elsevier Inc., Vol. 35 No. 1, pp. 8–30.

Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R.S., Diaz Brinton, R. & Mosconi, L. (2018), "Female Sex and Alzheimer's Risk: The Menopause Connection", *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, Vol. 5 No. 4, pp. 225–230.

Statistik, B.P.P.N.B. (2013), *Proyeksi Penduduk Indonesia Tahun 2010-20135*, *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 90, Badan Pusat Statistik, Jakarta, available at:<https://doi.org/10.1007/BF00830441>.

Sureda, A., Sanches Silva, A., Sánchez-Machado, D.I., López-Cervantes, J., Daglia, M., Nabavi, S.F. & Nabavi, S.M. (2017), "Hypotensive effects of genistein: From chemistry to medicine", *Chemico-Biological Interactions*, Elsevier Ltd, Vol. 268, pp. 37–46.

Thornton, K. & Chervenak, J. (2020), "Menopause and Sexuality", Vol. 44 No. 2015, pp. 649–661.

Tönnies, E. & Trushina, E. (2017), "Oxidative Stress, Synaptic Dysfunction, and Alzheimer's Disease", *Journal of Alzheimer's Disease*, Vol. 57 No. 4, pp. 1105–1121.

Trustinah. (1998), "Biologi Kacang Tunggak", *Monograf Balikatbi*, No. 3–1998, pp. 1–19.

Tsikas, D. (2017), "Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges", *Analytical Biochemistry*, Elsevier Inc, Vol. 524, pp. 13–30.

Uddin, M.S. & Kabir, M.T. (2019), "Emerging signal regulating potential of genistein against Alzheimer's disease: A promising molecule of interest", *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, Vol. 7 No. SEP, pp. 1–12.

Valotassiou, V., Malamitsi, J., Papatriantafyllou, J., Dardiotis, E., Tsougos, I., Psimadas, D., Alexiou, S., *et al.* (2018), "SPECT and PET imaging in Alzheimer's disease", *Annals of Nuclear Medicine*, Springer Japan, Vol. 32 No. 9, pp. 583–593.

Wang, J., Guo, M.N., Liu, Z.Z., Ma, S.F., Liu, W.J., Qian, J.J. & Zhang, W.N. (2021), "PGC-1 α reduces Amyloid- β deposition in Alzheimer's disease: Effect of increased VDR expression", *Neuroscience Letters*, Elsevier B.V., Vol. 744 No. December 2020, pp. 1–8.

Warner, M., Huang, B. & Gustafsson, J.A. (2017), "Estrogen Receptor β as a Pharmaceutical Target", *Trends in Pharmacological Sciences*, Elsevier Ltd, Vol. 38 No. 1, pp. 92–99.

Wiyasa, I.W.A. (2019), *Penatalaksanaan Osteoporosis Pasca Menopause*, UB Press, Malang.

Wojsiat, J., Zoltowska, K.M., Laskowska-Kaszub, K. & Wojda, U. (2018), "Oxidant/Antioxidant Imbalance in Alzheimer's Disease: Therapeutic and Diagnostic Prospects", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Vol. 2018, available at:<https://doi.org/10.1155/2018/6435861>.

Zaheer, M., Ahmed, S. & Hassan, M.M. (2020), "A review of medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Vigna mungo* (L.) Hepper", *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Vol. 9 No. 1, pp. 1307–1309.

LAMPIRAN

Lampiran 1 Keterangan Laik Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK "ETHICAL CLEARENCE"

No: 106-KEP-UB-2020

KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:

PENELITIAN BERJUDUL	: PENGRUH EKSTRAK ETHANOL KACANG TUNGGAK TERHADAP PEUBAHAN EPITEL VAGINA, DENSITAS TULANG, KARDIOVASKULAR, NEUROLOGI PADA TIKUS OVARIETOMI
PENELITI	: AN NISA FITHRI
ANGGOTA	: ELISA DANIK K TANTI TRI L NI PUTU SRI H
UNIT/LEMBAGA/TEMPAT	: UNIVERSITAS BRAWIJAYA
DINYATAKAN	: LAIK ETIK

Malang, 23 Oktober 2020
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



Prof.Dr.drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2 Keterangan Bebas Plagiasi



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN,
RISET, DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran, Malang 65145, Indonesia
Telp. +62341 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192, Fax. +62341 565420
E-mail : sekr.fk@ub.ac.id <http://fk.ub.ac.id>

SURAT KETERANGAN

Nomor 402 /UN10.F08.08/ PK.03.08.3/2021

Yang bertanda tangan dibawah ini,

nama : dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIP/NIK : 2012018705212001
pangkat dan golongan : Penata Muda Tk. I, III/b
jabatan : Ketua Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran

dengan ini menerangkan bahwa,

nama : Tanti Tri Lestary
NIM : 196070400111030
program studi : Magister Kebidanan
judul : Pengaruh Ekstrak Ethanol Kacang Tunggak (*Vigna unguiculata*) terhadap Penurunan Kadar Malondialdehyde (MDA) dan Ekspresi Amyloid β pada Otak Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Ovariektomi
jenis artikel : Tesis
jumlah halaman : 73

berdasarkan pemindaian dengan perangkat lunak Turnitin, Badan Penerbitan Jurnal Fakultas Kedokteran menyatakan bahwa Artikel Ilmiah tersebut diatas memiliki **kemiripan 5 %**

Demikian surat keterangan ini agar dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Malang, 23 Juli 2021

Ketua Badan Penerbitan Jurnal,

dr. Aulia Rahmi Pawestri, Ph.D.(Trop.Med.)
NIK 2012018705212001

Lampiran 3 Keterangan Accepted Jurnal



ICoLiST 2021

4th International Conference on Life Sciences and Technology

Universitas Negeri Malang, 31 August 2021

Website: <http://icolist.biologi.um.ac.id/2021>

Email: icolist.biologi@um.ac.id

Date: 1 August 2021

Letter of Acceptance for Abstract

Dear Authors: Elisa Danik Kurniawati(a*), Tanti Tri Lestary(b), Ni Putu Sri Haryati(c), Eviana Norahmawati(d), I Wayan Arsana Wiyasa(e), Tatit Nurseta(f), Dwi Yuni Hidayati(g), Loeki Enggar Fitri(h)

We are pleased to inform you that your abstract (ABS-60, Oral Presentation), entitled:

"Potency of Cowpea (*Vigna unguiculata*) as Antioxidant Agent in Ovariectomized Rat"

has been reviewed and accepted to be presented at ICoLiST 2021 conference to be held on 31 August 2021 in Malang, Indonesia.

Please submit your full paper and make the payment for registration fee before the deadlines, visit our website for more information.

Thank You.

Best regards,



Assist. Prof. Hendra Susanto, S.Pd., M.Kes., Ph.D.
ICoLiST 2021 Chairperson

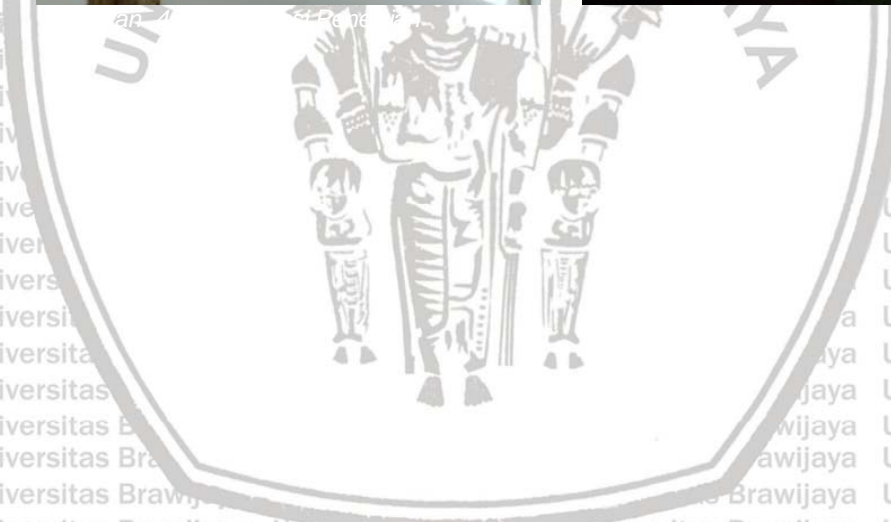
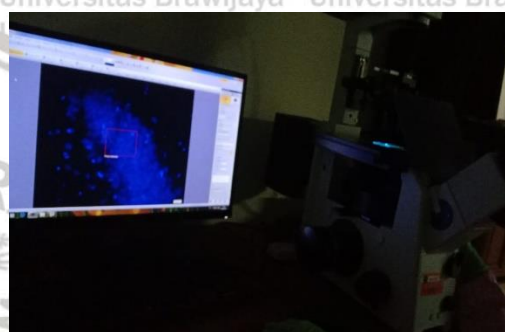
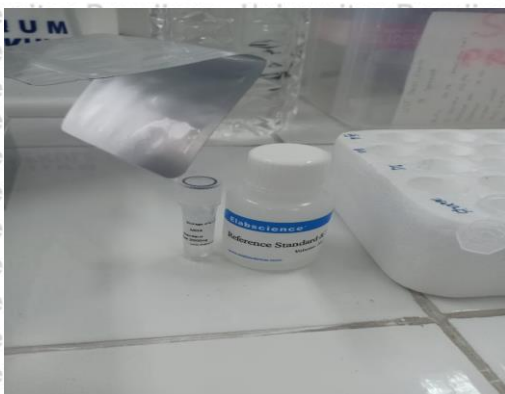


Konfrenzi.com - Conference Management System

Lampiran 4 Dokumentasi Penelitian







RIWAYAT HIDUP

Tanti Tri Lestary lahir di Kota Tarakan, 1 Januari 1994, merupakan anak pertama dari pasangan Bapak Karyono dan Ibu Sukarti. Mengampu pendidikan Sekolah Dasar di SDN 006 Tarakan dan lulus 2006. Mengampu pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP N 3 Tarakan dan lulus pada tahun 2009. Mengampu pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA N 1 Tarakan dan lulus pada tahun 2011. Kemudian melanjutkan pendidikan Diploma III Kebidanan di Universitas Respati Yogyakarta dan lulus tahun 2014. Kemudian pada tahun 2016 menyelesaikan pendidikan Diploma IV Bidan Pendidik di universitas yang sama. Memulai pendidikan di prodi Magister Kebidanan Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2019. Pada tahun 2014 penulis bekerja sebagai bidan di Praktik Mandiri Bidan Lia di Kota Tarakan. Pada tahun 2017 hingga sekarang penulis bekerja di Universitas Borneo Tarakan Provinsi Kalimantan Utara.

